Neue Untersuchungen über die Bedingungen der künstlichen Symbiose Mucor Ramannianus-Rhodotorula rubra

Inaugural-Dissertation

der

Philosophischen Fakultät der Universität Bern

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Heinrich Utiger

von Baar (Kt. Zug)

Bern / Buchdruckerei Büchler & Co. / 1942

Neue Untersuchungen über die Bedingungen der künstlichen Symbiose Mucor Ramannianus-Rhodotorula rubra

Inaugural-Dissertation

der

Philosophischen Fakultät der Universität Bern

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Heinrich Utiger

von Baar (Kt. Zug)

Bern / Buchdruckerei Büchler & Co. / 1942

Von der Philosophischen Fakultät II der Universität Bern auf Antrag des Herrn Prof. Dr. W. H. Schopfer angenommen.

Bern, den 5. März 1942.

Der Dekan: Prof. Dr. W. H. Schopfer.

Separatabdruck aus: „Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft"
1942, Band 52
(Als Sonderdruck ausgegeben am 12. November 1942)

Meinen lieben Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547623_0031

Neue Untersuchungen über die Bedingungen der künstlichen Symbiose Mucor Ramannianus-Rhodotorula rubra.

Von *Heinrich Utiger.*

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Bern.)

Eingegangen am 2. Juni 1942.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

I. Einleitung und Fragestellung 538
II. Technik und Morphologie der künstlichen Symbiose *Mucor Ramannianus—Rhodotorula rubra* 540
A. Technik der Symbiosezüchtung 540
B. Morphologie der Symbiose 542
III. Allgemeine Ernährungsbedingungen 542
A. Die Nährlösung 542
B. Die Kohlenstoffquellen 543
1. Glyzerin als Kohlenstoffquelle 544
a) Konzentrationsversuch mit Glyzerin 544
b) Glyzerin wird mit Tierkohle behandelt 546
C. Die Stickstoffquellen 546
1. Versuch mit organischen Stickstoffverbindungen 546
2. Andere organische und anorganische Stickstoffverbindungen . 548
D. Der Einfluss des Lichtes auf das Wachstum der Symbiose 549
IV. Die Wirkung von C-N-Quellen in verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstum der Symbiose 549
V. Die Wirkung von C-Quellen in verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstum der Symbiose 553
VI. Haben Metalle, insbesonders Spurenelemente spezielle Einflüsse auf das Wachstum der Symbiose? 554
VII. Der Einfluss von pflanzlichen und tierischen Extrakten auf das Wachstum der Symbiose mit anorganisch gebundenem Stickstoff . . 560
a) Der Einfluss von Pflanzenextrakt 560
b) Der Einfluss von tierischen Extrakten 561
VIII. Synergismus und Antagonismus der Spurenelemente 561
1. Synergismus 561
2. Antagonismus 562
IX. Spezielle Metallversuche 566
1. Versuch mit Natriummetaphosphat unter Ausschaltung des Kaliums 566
2. Einfluss der Metallmischung Me I in nicht gepuffertem Milieu auf das Wachstum der Symbiose, die KNO_3 als N-Quelle zur Verfügung hat 567
3. Einfluss der Metallmischung Me I in gepuffertem Milieu, in Gegenwart von Ammoniumsulfat als N-Quelle, auf das Symbiosewachstum 567

Seite

X. Reinigung der Nährlösung von Spurenelementen mit « Carbo medicinalis Merck » 568
XI. Der Einfluss von Metallen auf die Assimilation von Stickstoff . . . 570
XII. Wachstumsgeschwindigkeit der Symbiose in den verschiedenen Nährmilieus 574
XIII.
A. Besprechung der Resultate 575
B. Zusammenfassung 580
C. Literaturverzeichnis 581

I. Einleitung und Fragestellung.

Der Begriff der Symbiose, so wie ihn de Bary 1879 zum erstenmal verwendete, verlangt in seiner strengen Fassung, dass die beiden Partner, die in einem symbiontischen Verhältnis zueinander stehen, sich gegenseitig nützlich sind.

Es gibt natürliche und künstliche Symbiosen. Natürliche Symbiosen sind in der Natur häufig anzutreffen, während die künstlichen im Laboratorium entstehen. Ihr Zweck ist, weitere Aufschlüsse über physiologische Vorgänge in organischen Systemen zu erhalten. Mit der Erforschung der Wuchsstoffe wurde auch das Symbioseproblem von dieser Seite her untersucht und es wurden künstliche Symbiosen erzeugt.

Schopfer (1) hatte schon 1931 die Beobachtung gemacht, dass die Zygotenbildung bei *Phycomyces Blakesleeanus* durch eine, in der Maltose Kahlbaum enthaltenen Verunreinigung gefördert wurde. Ferner stellte er fest, dass ein Bierhefeauszug und eine Anreicherung des Vitamins B_1 aus diesem Extrakt ebenfalls starke Zygotenbildung hervorrief. Schopfer vermutete, dass diese Zygotenförderung durch eine Substanz, vitaminischer Natur ausgelöst wird, die der heutigen Vitamin-B-Gruppe angehören könnte.

R. Williams und seine Mitarbeiter, sowie Andersag und Westphal und Todd und Bergel führten 1937 die Aneurinsynthese durch. Dies war für die Mikrobiologie von ausschlaggebender Bedeutung, konnte doch von diesem Momente an dieses synthetisch hergestellte Vitamin für mikrobiologische Versuche herangezogen werden.

Die Festlegung der genauen Aneurinformel war Windaus und seinen Mitarbeitern schon im Jahre 1933 gelungen. Weitere Aufschlüsse betreffs der Struktur des Vitamins B_1 brachte 1935 R. Williams. Durch die Sulfitspaltung des reinen Aneurins erhielten Williams und seine Mitarbeiter zwei Spaltstücke :

$$\underset{}{C_{12}H_{18}ON_4SCl_2} + H_2SO_3 = \underset{(a)}{C_6H_9ONS} + \underset{(b)}{C_6H_9O_3N_3S} + 2HCl$$

Aus dem Spaltstück a identifizierten Buchman, Williams und Keresztesy ein Thiazol. Die Analyse des b-Anteiles ergab ein Pyrimidin (Cline, Williams, Ruehle und Waterman).

Das ganze Aneurinmolekül besteht demnach aus zwei Komponenten: Das 4-Methyl-5-β-hydroxyaethyl-thiazol und das 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidin. Diese Spaltprodukte sowie eine Anzahl von Substituenten sind ebenfalls synthetisch hergestellt worden.

Werden Sporen von *Phycomyces Blakesleeanus* in eine synthetische Nährlösung gebracht, so ergibt sich keinerlei Wachstum. Fügt man aber reines Vitamin hinzu, so setzt alsbald ein intensives Wachstum ein (Schopfer 2, 3 [1934]). Dieses Vitamin ist also ein unentbehrlicher Wachstumsfaktor für genannten Pilz.

Sind in der Nährlösung an Stelle des ganzen Aneurinmoleküls dessen beide Komponenten, Pyrimidin und Thiazol, vorhanden, so kann bei gewissen Organismen die gleiche Wirkung hervorgerufen werden wie mit Aneurin. Dies zeigte Knight mit *Staphylococcus aureus* (1937). Dieselbe Tatsache wurde auch für *Phycomyces Bl.* durch Schopfer und Jung und von Robbins und Kavanagh (1937) bestätigt. Ebenfalls gleich reagieren *Ustilago violacea* (Schopfer und Blumer, 1938) und andere Organismen.

Fehlt hingegen die eine oder die andere Komponente, so gelangen genannte Organismen zu keinem Wachstum mehr. Es gibt jedoch wiederum andere, wie die Hefe *Rhodotorula rubra,* die sich gut entwickelt, wenn nur Pyrimidin allein in der Nährlösung vorhanden ist (Schopfer [5] 1937), oder aber *Mucor Ramannianus,* der nur eines Zusatzes von Thiazol bedarf (Müller und Schopfer, 1937) Müller, 1, 2).

Rhodotorula rubra und *Mucor Ramannianus* sind partiell auxoautotroph, das will sagen, dass jeder dieser beiden Organismen die ihm fehlende Komponente, die zur Aneurinsynthese notwendig ist, zu synthetisieren vermag. Der Nachweis, dass dem tatsächlich so ist, wurde für *Rhodotorula rubra* von Schopfer (1939, 4) und für *Mucor Ramannianus* von Müller (2) erbracht. Eine weitere Bestätigung obiger Untersuchungen gelang durch die künstliche Symbiose der beiden Pilze (Müller und Schopfer, 1937). Werden nämlich die beiden Pilze *Rhodotorula rubra* und *Mucor Ramannianus* zusammen in wirkstofffreier Nährlösung kultiviert, so gelangen beide Symbionten zu beträchtlichem Wachstum, was beweist, dass Pyrimidin von *Mucor Ramannianus* und Thiazol von der *Rhodotorula rubra* synthetisiert werden, ansonst überhaupt keine Entwicklung gelänge. Schematisch kann dies in folgender Weise gezeigt werden :

Rhodotorula rubra		*Mucor Ramannianus*
synthetisiert Thiazol	⟶	erhält Thiazol
erhält Pyrimidin	⟵	synthetisiert Pyrimidin

Ausser dieser künstlichen Symbiose *Rhodotorula rubra-Mucor Ramannianus,* die Gegenstand näherer Untersuchungen ist, gibt es die-

jenige von Kögl und Fries zwischen *Nematospora gossypii,* die Biotin verlangt, aber imstande ist, Aneurin zu synthetisieren, und *Polyporus adustus,* welcher hingegen Biotin synthetisiert, aber auf Aneurin angewiesen ist.

Rivers beobachtete, dass *Hemophilus canis* den Faktor X (Hämatin) verlangt, jedoch den Faktor V (Cozymase) zu synthetisieren vermag. Umgekehrt synthetisiert *Hemophilus parainfluenza* den Faktor X selbst und ist auf den Faktor V angewiesen. Beide Organismen zusammen kultiviert ergeben ein ausgezeichnetes Wachstum, ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren.

Um die Verhältnisse der natürlichen Symbiose erforschen zu können, versucht man die beiden Partner zu trennen und sie getrennt zu kultivieren.

Die künstliche Symbiose versucht gerade das Gegenteil, nämlich zwei Organismen zusammenzubringen, damit sie unter speziellen Kulturbedingungen in Symbiose leben können.

Somit präzisiert sich die Problemstellung für die künstliche Symbiose *Rhodotorula rubra-Mucor Ramannianus,* indem spezifische Bedingungen ausfindig gemacht werden sollen, die nur für die beiden Pilze in Symbiose Gültigkeit besitzen.

II. Technik und Morphologie der künstlichen Symbiose Rhodotorula rubra - Mucor Ramannianus.

A. Technik der Symbiosezüchtung.

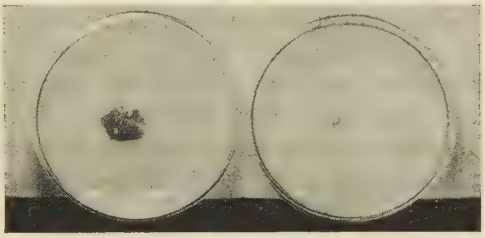
Rhodotorula rubra (Stamm aus Baarn) und *Mucor Ramannianus* Möll. werden auf Agar-Agar-Nährböden kultiviert. Von diesen Stammkulturen werden schwache Suspensionen in sterilem aq. dest. mit der Hefe *Rhodotorula rubra,* sowie mit Sporen des *Mucor Ramannianus* hergestellt. Von diesen homogenen Suspensionen werden je gleichviele Tropfen mit einer sterilen Glaspipette entnommen und in eine wuchsstofffreie Nährlösung gebracht.

Um die erhaltenen Resultate zwischen *Rhodotorula rubra* und *Mucor Ramannianus* einerseits, und ihrem Wachstum anderseits miteinander vergleichen zu können, sollte nur ein einheitliches Mass verwendet werden. Dies ging aber technisch nicht gut. Die Entwicklung der Hefe wurde so bestimmt, indem die Lichtabsorption mit dem lichtelektrischen Kalorimeter nach Dr. B. Lange gemessen wurde. Dieser nephelometrische Wert (NW) wird in Prozenten angegeben. Das Myzel von *Mucor Ramannianus* wurde zuerst ausgewaschen und hierauf im Thermostaten bei 110° C getrocknet und nachher gewogen. Der Vergleich zwischen % NW und mg Trockengewicht kann nur relativ sein. *In der Symbiose muss aber zwischen beiden Pilzen ein Gleichgewicht*

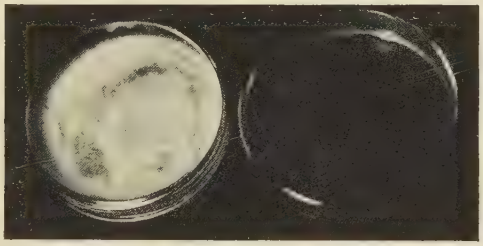
herrschen. Dieses drückt sich nicht in den Gewichten der beiden Symbionten aus, sondern vielmehr durch die gleich grosse Pyrimidin- und Thiazolproduktion. Durch das Auswaschen des Symbiosemyzels erleidet eine Kultur einen Verlust von höchstens 3 %. Dieser ist bedingt durch den Verlust der Hefezellen, die sich auf dem Boden des Kulturkolbens befinden, und einem sehr kleinen Teil, der beim Auswaschen entfernt

Abbildung 1.

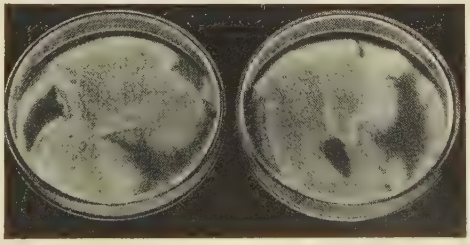
Die beiden Organismen *Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula rubra* einzeln, und in Symbiose kultiviert.



Figur 1.
Rhodotorula rubra, links mit Pyrimidin, rechts ohne.



Figur 2.
Mucor Ramannianus, links mit Thiazol, rechts ohne.



Figur 3.
Die beiden Organismen zusammen ohne Wuchsstoffzusatz kultiviert.

wird. Auf das Gesamtgewicht hat jedoch dieser Verlust keine grössere Bedeutung. Das Gewichtsverhältnis zwischen den beiden Partnern in der Symbiose ist ungefähr folgendes :

Rhodotorula rubra = 1 (mit Glukose als C-Quelle)
Mucor Ramannianus = 9

B. Morphologie der Symbiose.

In den ersten 10 Tagen entwickelt sich *Rhodotorula rubra* nur spärlich. Ebenso *Mucor Ramannianus,* der nur ein ganz dünnes, submerses Myzel bildet. Die Zellen dieses submersen Myzels sind mit einer feinen, granulösen Masse gefüllt. Nach diesem Zeitpunkt beginnen plötzlich kleine Myzelklümpchen des *Mucor Ramannianus* mit in den Zellramifikationen eingeschlossenen Zellen von *Rhodotorula rubra* an die Oberfläche der Nährlösung zu steigen. Es folgen nun immer mehr und mehr, und diese bilden schlussendlich eine feste Myzeldecke auf der ganzen Oberfläche des flüssigen Nährmilieus. Die aufsteigenden Myzelflocken haben eine andere Zellstruktur als das submerse Myzel. Sie besitzen Riesenzellen, die prall angefüllt sind mit Fetttröpfchen. Durch diese Fettspeicherung wird das spezifische Gewicht dieser Zellen gegenüber der Nährlösung erniedrigt und die Zellverbände vermögen an die Oberfläche zu steigen. *Rhodotorula rubra* hat sich auch maximal entwickelt. Das ramifizierte Mucorgewebe ist mit Hefezellen stark durchdrungen. Ein kleinerer Teil von ihnen setzt sich auf den Boden des Kulturkolbens sowie am Rande fest und umgibt die ganze Kultur mit einem roten Saum. Beide Pilze zusammen bilden eine einzige Masse, und, makroskopisch gesehen, könnte nicht beurteilt werden, ob es sich um einen oder um zwei Pilze handle.

III. Allgemeine Ernährungsbedingungen.

A. Die Nährlösung.

Ausgegangen wurde von folgender Nährlösung :

Glukose puriss.	4 %	
Asparagin	1 ‰	
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,5 ‰	pH = 4,6
KH_2PO_4	1,5 ‰	

Rhodotorula rubra und *Mucor Ramannianus* wurden in Symbiose ohne Wuchsstoffzugabe kultiviert, hingegen erhielten die Symbionten für sich allein je 0,2 γ Pyrimidin oder Thiazol[1] pro 20 ccm Nährlösung.

Alle Versuche wurden in Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas von 150 ccm Inhalt ausgeführt und mit 20 ccm Nährlösung beschickt. Als Pfropfen wurde reinste Spitalwatte verwendet, da es sich gezeigt hatte, dass die rohe Spitalwatte wuchsstoffhaltig ist (Schopfer und Rytz, 1937). Die Nährlösung wurde in einem Autoklaven sterilisiert, 20 Minuten bei 120° C.

[1] Die Ausdrücke Pyrimidin und Thiazol bedeuten immer die beiden Komponenten des Aneurins (S. 538).

B. Die Kohlenstoffquellen.

Das Verhalten von *Mucor Ramannianus* und von *Rhodotorula rubra* einzeln und in Symbiose gegenüber verschiedenen Kohlenstoffverbindungen wird in Tabelle 1 geprüft. Die Nährlösung ist die gleiche wie auf Seite 542, nur dass als C-Quelle die verschiedensten Kohlenstoffverbindungen angewendet werden. Die Versuchsdauer betrug 24 Tage. Die thermolabilen Substanzen wurden kalt sterilisiert[1] zugegeben. Es wurden keine Wuchsstoffe den angegebenen Milieus beigefügt. Konnte man trotzdem ein Wachstum feststellen, so handelt es sich um Substanzen, von denen man weiss, dass sie Wuchsstoffe als Verunreinigungen enthalten.

Tabelle 1.

Die Assimilierbarkeit der verschiedenen Kohlenstoffquellen durch *Rhodotorula rubra, Mucor Ramannianus,* einzeln und in Symbiose.

	Rhodotorula rubra	Mucor Ramannianus	Symbiose
Kontrolle ohne C	6 % NW	0	0 mg TG
l-Arabinose . . . . . 4 %	6	0	170
d-Xylose . . . . . 2 %	40	0	155
l-Rhamnose . . . . . 2 %	4	0	190
d-Glukose . . . . . 4 %	4	0	190
d-Mannose (Roche) . . . . . 4 %	7	0	185
d-Galaktose . . . . . 4 %	6	0	180
d-Lävulose (Roche) . . . . . 4 %	20	5	180
Maltose (Kahlbaum) . . . . . 4 %	40	150	200
Lactose ger. . . . . 4 %	28	0	150
Saccharose . . . . . 4 %	10	0	190
Cellobiose . . . . . 4 %	3	0	0
Raffinose . . . . . 2 %	30	0	170
Inulin . . . . . 1 %	34	120	150
Dextrin . . . . . 1 %	51	0	165
Stärke (Kartoffel) . . . . . 1 %	48	130	160
Cellulose . . . . . 1 %	2,5	0	0
Arbutin . . . . . 0,5 %	3	0	20
Aesculin . . . . . 0,5 %	4	0	25
Amygdalin . . . . . 0,5 %	40	0	15
Salicin . . . . . 1 %	30	10	20
Saponin . . . . . 1 %	45	10	25
d-Sorbit (Kahlbaum) . . . . . 4 %	10	0	180
d-Mannit (Schuchardt) . . . . 4 %	10	0	230
d-Erythrit (Schuchardt) . . . 2 %	6	0	170
d-Arabit (Schuchardt) . . . . 4 %	35	170	180
Alkohol absol. . . . . 4 %	7	0	7
Glyzerin Ph. H. V. . . . . 5 %	49	62	5

[1] Um Flüssigkeit kalt sterilisieren zu können, wurden die Bakterienfilter 17 G 5 auf 3, Schott, Jena, verwendet. TG bedeutet Trockengewicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der grösste Teil der Kohlehydrate von beiden Pilzen in Symbiose assimiliert werden kann. Dieselben Verbindungen werden aber auch gleich gut ausgenützt, wenn die beiden Symbionten getrennt, mit Wuchsstoffzusatz kultiviert werden. Einige dieser Kohlehydrate, die nicht genügend gereinigt in den Handel gelangen, enthalten Wuchsstoffe als Begleitsubstanz. Verunreinigungen, die als Wachstumsfaktoren für *Rhodotorula rubra* anzusehen sind, übertreffen diejenigen, die aktiv auf *Mucor Ramannianus* wirken. Die erhaltenen Resultate sind Durchschnittswerte von 4 Kulturen.

1. Glyzerin als Kohlenstoffquelle und Wuchsstoffquelle.

Glyzerin wird in der Mikrobiologie oft in komplex zusammengesetzten Nährböden verwendet. Es soll nun hier untersucht werden, ob sich Glyzerin als Kohlenstoffquelle für *Rhodotorula rubra*, wie auch für *Mucor Ramannianus* eignet, und ob Glyzerin eventuell Wuchsstoffe als Begleitsubstanz enthält.

a) Konzentrationsversuch mit Glyzerin.

Verwendet wurde Glyzerinum puriss. Ph. H. V. Dieses und die üblichen Mineralsalze wurden zusammen autoklaviert bei 115° C während 20 Minuten. Die Kulturdauer beträgt 41 Tage, die Temperatur 20° C. T oder P[1] wurden 0,4 γ pro 20 ccm Nährlösung beigefügt.

Rhodotorula rubra wächst auf Glyzerin gut, ohne Zugabe von Pyrimidin. Mit Pyrimidin werden jedoch etwas höhere Werte erhalten. In beiden Versuchsreihen wird eine starke Pigmentbildung entwickelt (Lachsrot).

Mucor Ramannianus wächst ohne Thiazol ziemlich gut, steigert aber seine Entwicklung beträchtlich, sobald Thiazol zugefügt wird. In seinem Myzel wird eine starke, gelbe Färbung wahrgenommen. In beiden Fällen dürfte es sich um Karotinfarbstoffe handeln. *Mucor Ramannianus* ohne T gelangt zu einer maximalen Entwicklung bei einer Konzentration von 10 %, mit T befindet sich diese schon bei 4 % und geht bei 10 % nicht wesentlich über den Kontrollversuch hinaus.

In Symbiose entwickelt sich nur die Hefe normal und *Mucor Ramannianus* kommt nur zu einem schwachen, submersen Myzel. Es muss angenommen werden, dass die beiden Organismen physiologisch sich nicht gleich verhalten und dass in diesem Fall die Hefe wachstumshemmende Stoffe bildet in Bezug auf *Mucor Ramannianus*. Hier haben wir eine typische Antibiose, wo die Hefe den *Mucor Ramannianus* nachteilig beeinflusst, respektive die Nährlösung.

[1] Die Ausdrücke P oder T bedeuten immer die beiden Komponenten des Aneurins. Der Einfachheit wegen wird der exakte chemische Ausdruck nicht jedesmal angeführt.

Im Falle der Kontrollkulturen von *Rhodotorula rubra* wie auch in denjenigen des *Mucor Ramannianus* stellt sich somit die Frage : Beruht das Wachstum der beiden Pilze darauf, dass das angewendete Glyzerin die beiden Aneurinkomponenten als Begleitsubstanz enthält, oder aber sind die beiden partiell auxo-heterotrophen Organismen in diesem Milieu plötzlich auxo-autotroph geworden ?

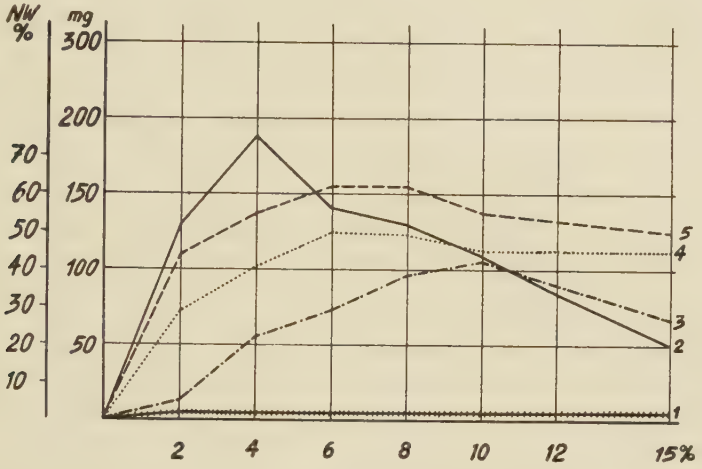


Abbildung 2.
Glyzerinkonzentrationsversuch.

Rhodotorula rubra .	+ P 5
Rhodotorula rubra .	— P 4
Mucor Ramannianus	+ T 2
Mucor Ramannianus	— T 3
Symbiose	1

F r o m a g e o t und T c h a n g sind in einer ihrer Arbeiten über die Synthese von Karotinen bei *Rhodotorula Sanniei* in einem Milieu, das Glyzerin enthielt, zu dem Schluss gekommen, dass das angewendete Glyzerin nicht mit dem Vitamin B_1 oder seinem Komponenten Pyrimidin verunreinigt sei. Ihre Untersuchungen habe ich einer näheren Betrachtung unterzogen, denn *Rhodotorula Sanniei* ist wie *Rhodotorula rubra* ein P-Organismus.

Glyzerin wird in den Versuchen von F r o m a g e o t als Kohlenstoffquelle in einer Konzentration von 5 % angewendet. Er bediente sich eines reinen Glyzerins, das im Vakuum mehrfach destilliert worden war. Es muss hier speziell betont werden, dass *Rhodotorula Sanniei,* kultiviert auf Glukose allein + B_1, oder auf Glyzerin, oder Glyzerin + Glukose, keinen wesentlichen Unterschied auf das Trockengewicht der *Hefe* zur Folge hatte. Was die Karotinbildung jedoch betrifft, hatte es einen Einfluss. F r o m a g e o t kommt nach seinen Versuchen zu dem

Schlusse, dass *Rhodotorula Sanniei* in Glyzerin auxo-autotroph wird, und dass das von ihm gereinigte Glyzerin kein Aneurin enthält. Es wäre dies einer der Fälle, wo ein partiell auxo-heterotropher Organismus Bedingungen vorfände, in denen er auxo-autotroph würde (S c h o p f e r, 4). Leider hat es F r o m a g e o t unterlassen, mit seinem Glyzerin einen Tierkohle-Adsorptionsversuch zu machen, um ganz sicher zu sein, dass tatsächlich keine Aneurinverunreinigungen mehr in diesem Glyzerin vorhanden sind, um so mehr, da ja aktive Tierkohle Aneurin quantitativ zu adsorbieren vermag.

Ich war in der Lage über einige ccm Glyzerin von F r o m a g e o t[1] verfügen zu können, die er uns in freundlichster Weise überlassen hatte. Sie genügten jedoch nicht mehr, um einen Tierkohle-Adsorptionsversuch durchführen zu können.

b) **Glyzerin wird mit Tierkohle behandelt.**

Glycerinum puriss. Ph. H. V. wurde mit aktiver Kohle (Carbo medicinalis « Merck »), die Aneurin quantitativ zu adsorbieren vermag, behandelt. Auf 650 g Glyzerin wurden 10 g Kohle zugegeben, dies alles schnell erhitzt und sofort filtriert.

Auf diesem Glyzerin gelangten weder *Rhodotorula rubra,* noch *Mucor Ramannianus* zu irgendwelchem Wachstum, wenn ihnen keine Wuchsstoffe zur Verfügung standen. Nichtbehandeltes Glyzerin ermöglichte in beiden Fällen ein Wachstum genannter Pilze. Es dürfte somit als erwiesen betrachtet werden, dass das unbehandelte Glyzerin tatsächlich Aneurin, oder seine beiden Komponenten Pyrimidin und Thiazol als Verunreinigung enthielt. Enthält auch dieses redestillierte Glyzerin Spuren von Pyrimidin, die mit einer Kohlebehandlung hätten entfernt werden können ? Es war uns nicht möglich, diese Frage einer näheren Prüfung zu unterziehen. In dem von F r o m a g e o t gelieferten Glyzerin, das nicht mit Aktivkohle behandelt wurde, kamen auch Kontrollkulturen von *Rhodotorula rubra,* ohne Pyrimidinzusatz, zu guter Entwicklung.

C. Stickstoffquellen.

1. Versuche mit organischen Stickstoffverbindungen.

Die Auswertbarkeit von organischen Stickstoffverbindungen wurde nur mit der Symbiose geprüft. Kontrollkulturen von *Rhodotorula rubra* und von *Mucor Ramannianus* wurden auch angesetzt, um zu sehen, ob die eine oder die andere der Aminosäuren eventuell wuchsstoffhaltig sein könnte. Die thermolabilen Verbindungen wurden wiederum kalt sterilisiert zugegeben, und die Versuchsdauer betrug 35 Tage. Als Durchschnitt wurde das Mittel von 5 Kulturen genommen.

[1] Herrn Prof. Fromageot, Lyon, sind wir zu grossem Dank verpflichtet, für die Ueberlassung einiger Proben von seinem « glycérine pure, rédistillée dans le vide ».

Tabelle 2.

Versuche mit organischen Stickstoffverbindungen.

Stickstoffquelle 1‰	Rhodotorula rubra	Mucor Ramannianus	Symbiose
Glykokoll	5 % NW	0 mg TG	33 mg TG
d-Alanin	8	0	157,5
l-Alanin	1	3	71,0
d, l-Alanin	3	0	180,3
l-Valin	3	0	140,0
d-Valin	4	0	127,0
d, l-Valin	4	0	130,0
d-Leucin	5	0	60,0
l-Leucin	3	0	20,0
d, l-Leucin	6	0	58,0
d-Isoleucin	2	0	32,7
l-Isoleucin	4	0	10,0
d, l-Isoleucin	3	0	37,5
l-Asparaginsäure	8	0	88,5
d, l-Asparaginsäure	5	0	94,0
l-Asparagin	5	0	171,7
d-Arginin	1	0	196,8
d-Ornithindihydrochlorid	7	0	0
d-Lysindihydrochlorid	4	0	1
l-Histidin	6	0	33,3
d-Histidinmonohydrochlorid	6	0	52,6
l-Histidinmonohydrochlorid	5	0	64,3
d, l-Histidinmonohydrochlorid	8	0	76,3
l-Phenylalanin	1	0	48,3
d-Phenylalanin	1	0	24,9
d, l-Phenylalanin	1	0	38,8
l-Tyrosin	10	0	10,0
d-Dioxyphenylalanin	4	0	98,7
l-Tryptophan	1	0	0
d, l-Serin	1	0	51,0
l-Cystin	10	0	56,0
l-Prolin	5	0	178,5
d, l-Prolin	4	0	79,5
d, l-Alanyl-glycin	10	0	225,0
Diglycyl-glycin	9	0	124,0
l-Leucyl-glycyl-glycin	6	0	211,0
d-Leucyl-glycyl-glycin	6	0	197,0
d, l-Leucyl-glycyl-glycin	8	0	197,4
Glycyl-glycyl-glycin	8	0	185,0
Chloracetyl-l-leucin	3	0	0
Chloracetyl-l-tyrosin	4	0	0
Chloracetyl-l-tryptophan	7	0	0

Nicht alle diese Aminosäuren können gleich gut assimiliert werden, was darauf zurückzuführen ist, dass eben nur gewisse chemische Konfigurationen günstig sind für das Fermentsystem der beiden Symbionten, andere wiederum ungünstig. Da, wo alle drei Modifikationen untersucht werden konnten, ergab am Anfang immer diejenige das grössere Wachstum, die auch in der Natur vorzukommen pflegt (G a u s e).

Ohne Wuchsstoffzufuhr kommen weder *Mucor Ramannianus,* noch *Rhodotorula rubra* zu einem Wachstum, was bedeutet, dass keine der angewandten Aminosäuren, noch Peptide irgendwelche, für die beiden Symbionten in Frage kommenden Wuchsstoffe als Verunreinigungen enthalten.

2. Andere organische und anorganische Stickstoffverbindungen.

Tabelle 3.

Stickstoffquelle 1 ‰	Mucor Ramannianus		Symbiose	Rhodotorula rubra		
	—Gl.[1]	Gl.+T		—Gl.	Gl.	Gl.+P
	mg Tg			% NW		
Ammoniumsulfat . . .	0	26,0	2	1	1	51
Ammoniumnitrat . . .	0	42,0	2	0	8	5
Ammoniumchlorid . . .	0	31,0	2	2	5	38
Ammoniumcarbonat . .	0	100,0	2	0	5	57
Ammoniak ½ ‰ . . .	0	1,0	0	0	6	86
Kaliumnitrat	0	185,0	2	1	1	1
Calziumnitrat	0	160,0	1	0	3	2
Ammoniumcitrat . . .	0	225,0	*140,0*	9	4	33
Ammoniumtartrat . . .	0	20,0	*130,0*	0	6	35
Harnstoff	0	160,0	*110,0*	0	7	86

[1] Gl = Glukose.

Dieser Versuch zeigt, dass die Symbiose nur da zustande kommt, wo ihr eine Stickstoffverbindung geboten wird, in der auch zugleich noch Kohlenstoff vorhanden ist. Die beiden Organismen können mit einer Stickstoffquelle, die keinen Kohlenstoff gebunden enthält, sich normal entwickeln, wenn ihnen die fehlende Aneurinkomponente geboten wird. In Symbiose dagegen erfolgt keinerlei Wachstum mehr. Es scheint, dass *Rhodotorula rubra* und *Mucor Ramannianus* in Symbiose einer C-N-Quelle bedürfen. Ferner können Nitrate von *Mucor Ramannianus* assimiliert werden, *Rhodotorula rubra* hingegen vermag dies nicht. Stickstoff und Kohlenstoff unabhängig voneinander der Symbiose geboten, führt zu keinem Wachstum.

D. Der Einfluss des Lichtes auf das Wachstum der Symbiose und das der beiden Symbionten.

Mucor Ramannianus und *Rhodotorula rubra* synthetisieren in Symbiose sowohl Pyrimidin als auch Thiazol. Eine Synthese ist immer mit einem Energieaufwand verbunden, und es soll in diesem Versuch untersucht werden, ob die Energie, die zur Synthese der Wuchsstoffe führt, vom Licht abhängig ist oder nicht.

Der Versuch wurde mit der üblichen Nährlösung angesetzt. Die eine Kulturserie wurde dem Tageslicht ausgesetzt und die andere wurde im Dunkeln gehalten, bei 20° C, während 30 Tagen. Die erhaltenen Resultate sind die Mittel aus je 10 Kulturen.

Lichtversuch		Dunkelversuch
150 mg TG	*Mucor Ramannianus* + T	167 mg TG
81 % NW	*Rhodotorula rubra* + P	82 % NW
74 mg TG	Symbiose	92 mg TG

Die erhaltenen Gewichte von *Mucor Ramannianus* und von der Symbiose sind im Dunkeln um ein weniges höher als diejenigen im Licht. Bei den höheren Pflanzen wird nach Bonner und Greene Aneurin vorwiegend im Licht synthetisiert. Bei den symbiontischen Pilzen erfolgt die Aneurinsynthese ohne Lichtenergie, ja es scheint, dass das Licht eher ein wenig hemmend auf das Wachstum der Symbiose wirkt.

IV. Die Wirkung von C-N-Quellen in verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstum der Symbiose.

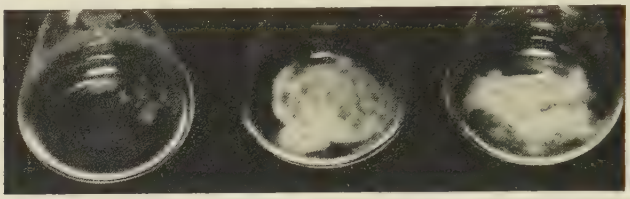
Wir wir in den Versuchen mit organischen und anorganischen Stickstoffquellen gesehen haben, gelangt die Symbiose nur da zu einem Wachstum, wo ihr eine C-N-Verbindung zur Verfügung steht.

Von der Arbeitshypothese ausgehend, dass in Symbiose nur da eine Wuchsstoffsynthese stattfinden könne, wo schon eine präformierte C-N-Bindung vorhanden sei, wird hier untersucht, in was für einer Konzentration diese C-N-Bindung vorhanden sein muss, um ein Wachstum der Symbiose zu garantieren. Es wurden verschiedene C-N-Quellen bis zu Konzentrationen von Wuchsstoffstärke untersucht. Da die Synthese der betreffenden Aneurinkomponenten nur in geringer Intensität geschieht, so könnte man vermuten, dass eine C-N-Quelle in eben kleiner Konzentration vollauf genüge, um eine Synthese zu ermöglichen.

Es wurde folgende Nährlösung angewendet: Glukose 4 %, KNO_3 1 ‰, KH_2PO_4 1,5 ‰, $MgSO_4$ 0,5 ‰. Die Versuchsdauer betrug 47 Tage.

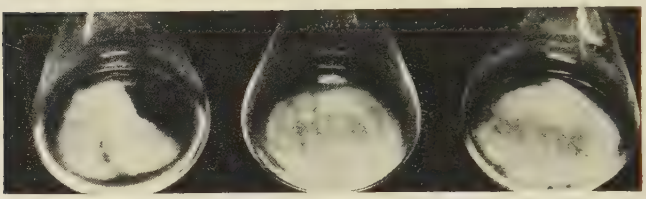
Abbildung 3.

Mucor Ramannianus und *Rhodotorula rubra* in Symbiose auf Ammoniumcitrat.



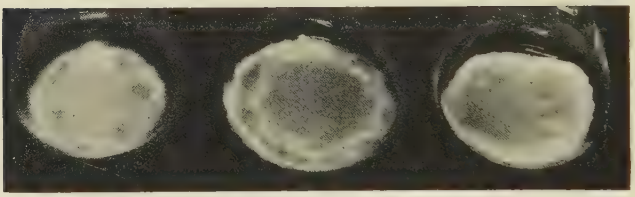
0 0,2 0,4 γ

Figur 4.



1 10 100 γ

Figur 5.

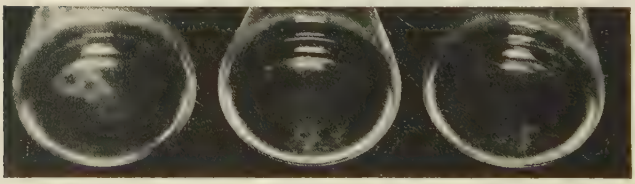


1000 10 000 20 000 γ

Figur 6.

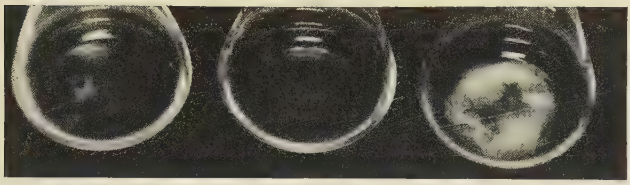
Abbildung 4.

Mucor Ramannianus und *Rhodotorula rubra* in Symbiose auf Ammoniumtartrat.



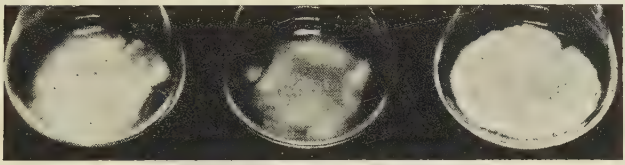
0 0,2 0,4 γ

Figur 7.



1 10 100 γ

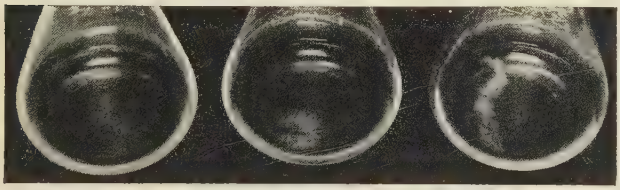
Figur 8.



1000 10 000 20 000 γ

Figur 9.

Abbildung 5.
Mucor Ramannianus und *Rhodotorula rubra* in Symbiose auf Harnstoff.

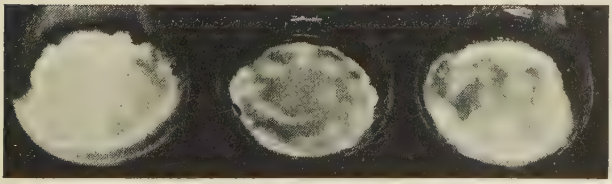


0 0,2 0,4 γ

Figur 10.

1 10 100 γ

Figur 11.



1000 10 000 20 000 γ

Figur 12.

Tabelle 4.
Das Symbiosewachstum mit C-N-Quellen in verschiedenen Konzentrationen.

Konzentration der C-N-Verbindung γ	0	0,2	0,4	1	10	100	1000	10000	20000	
Mucor Ramannianus Kontrolle mg TG .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mucor Ramannianus Thiazol mg TG .	0	80	190	201	204	211	—	—	—	
Rhodotorula rubra Kontrolle % NW .	—	4	4	3	4	4	—	—	—	
Symbiose + Ammoniumcitrat . . .	0	10	30	36	44	50	50	125	165	mg TG
Symbiose + Asparagin	0	1	3	4	4	17	45	145	154	mg TG
Symbiose + Ammoniumtartrat . .	0	2	4	8	9	17	37	89	137	mg TG
Symbiose + Harnstoff	0	0	0	0	1	10	150	240	245	mg TG

Es stellt sich heraus, dass einzig das Ammonimcitrat schon in einer Konzentration von 0,4 γ ein mässiges Wachstum erlaubt, alle andern C-N-Quellen hingegen ergeben erst bei 1000 γ, das sind 0.05 ‰, ein Wachstum, das ausser demjenigen des Harnstoffs als gering zu bezeichnen ist. Eine volle Entwicklung der Symbiose wird erst mit 20 000 γ erreicht, dies entspricht einer Konzentration von 1 ‰ (die Photographien sind auf den Seiten 550/51 zusammengestellt). Im Falle von Ammoniumcitrat, das in einer Konzentration von 0,4 γ schon 30 mg Trokkengewicht der Symbiose liefert, könnte man fast glauben, dass die Hypothese richtig wäre, die besagt, dass zur Wuchsstoffsynthese eine höchst geringe Konzentration einer C-N-Quelle notwendig sei. Da die andern untersuchten C-N-Verbindungen nicht ein gleiches Verhalten zeigen, so muss man annehmen, dass dem eben nicht so ist. Wenn nämlich mit 0,4 γ Ammoniumcitrat die Wuchsstoffsynthese gesichert wäre, so müsste das Endtrockengewicht bedeutend höher ausfallen, als es wirklich ist. Es ist zu vermuten, dass in diesem Falle die anorganische Stickstoffquelle sozusagen nicht verwertet werden kann, was aus dem niedrigen Trockengewicht zu ersehen ist. Es wäre aber nicht ausgeschlossen gewesen, wenn eine C-N-Quelle in vitaminischer Konzentration ein Wachstum der Symbiose auf anorganischem Stickstoff ermöglicht hätte. *Nach den bisher untersuchten Bedingungen scheint es tatsächlich der Fall zu sein, dass die beiden Organismen in Symbiose nur dann zu einem Wachstum kommen, wenn ihnen eine gemeinsame C-N-Quelle zur Verfügung steht.*

V. Die Wirkung von C-Quellen in verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstum der Symbiose.

Wie wir gesehen haben, gelingt das Symbiosewachstum mit einer Ammoniumverbindung, die organisch gebunden ist, gut. Es wird nun geprüft, ob dies auch der Fall ist, wenn man das Ammoniumsalz und die zugehörige Säure voneinander getrennt gibt.

Die Nährlösung besteht aus : Glukose 4 %, KH_2PO_4 1,5 ‰, KNO_3 1 ‰, $(NH_4)_2SO_4$ 1 ‰, $MgSO_4$ 0,5 ‰. Die Versuchsdauer beträgt 49 Tage.

Die Resultate sind aus der Tabelle 5, Seite 554 ersichtlich.

Wie zu erwarten, ergaben auch diese Versuche völlig negative Resultate. Es wurden bis 9 mg Trockengewicht erreicht, was einer starken Kontrollkultur gleichkommt, da diese Serie aussergewöhnlich stark beimpft worden war. Das Myzel von *Mucor Ramannianus* ist stark granulös, wie es sonst nur das submerse Myzel ist. *Diese Versuche beweisen wiederum, dass die Symbiose nur dann zu einem Wachstum gelangt, wenn ihr eine C-N-Quelle geboten wird.* Diese organischen Verbindungen können Aminosäuren oder auch Ammoniumverbindungen sein. Trennen wir nun diese organisch gebundenen Ammoniumverbindungen, indem wir der Nährlösung das Ammonium separat und die dazugehörige Säure separat geben, d. h. an Stelle von Ammoniumcitrat geben wir Ammoniumsulfat und Zitronensäure zur Nährlösung, so ist ein Wachstum der Symbiose ausgeschlossen, obwohl die beiden Partner, getrennt, mit der notwendigen Aneurinkomponente in der Nährlösung, sowohl mit Ammoniumsulfat als auch mit Ammoniumcitrat zu gutem Wachstum gelangen.

In Symbiose müssen von den beiden Organismen sowohl Pyrimidin als auch Thiazol synthetisiert werden. In Einzelkultur hingegen wird ihnen die eine oder die andere der Aneurinkomponente hinzugegeben, damit sie sich entwickeln können. In Anwesenheit der für sie notwendigen Aneurinkomponente assimilieren sie ohne Schwierigkeit anorganisch gebundenen Stickstoff und die Proteosynthese scheint leicht vor sich zu gehen, was aber nicht mehr der Fall ist, wenn sie in Symbiose leben.

In diesem Falle bietet sich uns unserer Fragestellung entsprechend eine Bedingung, die für den einzelnen Pilz günstig ist, nicht so für die Symbiose. In Symbiose mit anorganisch gebundenem Stickstoff müssen, so scheint es uns, ganz spezielle Bedingungen vorhanden sein, ansonst der Stickstoff nicht assimiliert werden kann. Es stellt sich uns die sehr wichtige Frage, in welcher Weise die Biosynthesen durch diese ungünstigen Ernährungsbedingungen beeinträchtigt, sogar unmöglich gemacht werden ? Wird die Wuchsstoffsynthese direkt oder durch die Uebermittlung einer anderen Biosynthese (Proteosynthesen) herabgesetzt ?

Tabelle 5.
Das Symbiosewachstum mit C-Quellen in verschiedenen Konzentrationen.

Konzentrationen der C-Verbindung γ	0	0,2	0,4	1	10	100	1000	10000	20000
Mucor Ramannianus Kontrolle mg TG	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mucor Ramannianus + Thiazol mg TG . . .	0	85	190	195	210	210	—	—	—
Rhodotorula rubra — Pyrimidin % NW . . .	0	3	4	4	3	5	—	—	—
Rhodotorula rubra + Pyrimidin % NW . . .	0	73	74	76	80	81	—	—	—
Symbiose + Zitronensäure mg TG	0	3	3	3	4	5	6	8	8
Symbiose + Weinsäure .	0	3	3	4	4	4	5	7	7
Symbiose + Bernsteinsäure	0	2	2	3	4	5	5	6	8
Symbiose + Palmitinsäure	0	3	3	4	5	5	8	8	8
Symbiose + Malonsäure .	0	2	4	4	5	7	7	8	8
Symbiose + Essigsäure .	0	4	6	6	7	8	8	8	8
Symbiose + Oxalsäure .	0	4	5	7	6	7	7	7	8
Symbiose + Traubensäure	0	3	5	5	8	8	7	8	9

Es soll nun Aufgabe der nächsten Kapitel sein, diese Frage zu lösen und Bedingungen zu finden, die ein Symbiosewachstum mit anorganisch gebundenem Stickstoff erlauben.

VI. Haben Metalle, insbesonders Spurenelemente spezielle Einflüsse auf das Wachstum der Symbiose?

Die bisherigen Symbioseversuche haben unzweideutig gezeigt, dass Symbiosekulturen mit anorganischem Stickstoff vollständig negativ ausfallen. *Wir haben konstatiert, dass Substanzen, die voneinander sehr verschieden sind (Harnstoff, Ammoniumcitrat, Ammoniumtartrat, Glutaminsäure) gleich wie Asparagin wirkten und die Symbiose ermöglichten.*

Die Ursache dieser unerwarteten Erscheinung kann in verschiedener Art und Weise interpretiert werden. Trotz der chemischen Verschiedenheit dieser Substanzen muss irgendwelche, gemeinsame Eigenschaft existieren. Es fällt zunächst unbedingt auf, dass alle diese Substanzen C und N enthalten, wir können aber nicht klar ersehen, ob diese Merkmale ihre Wirksamkeit im Symbioseversuch bewirken.

Es ist bekannt (siehe weiter), dass auch die reinsten chemischen Substanzen kaum nachweisbare Spuren von Elementen enthalten können. Steinberg (Seite 558) hat beispielsweise mit Hilfe von Spektralanalysen einwandfrei nachgewiesen, dass alle Bestandteile der Pfefferschen Nährlösung, namentlich Zucker (Dextrose) eine beträchtliche Zahl von Metallen mitschleppt.

Wir stellen somit als Arbeitshypothese auf, dass die Entwicklung der Symbiose von mineralischen Substanzen mit katalytischer Wirkung abhängig ist. Dieselben werden im Asparagin vorhanden sein, fehlen aber dem Ammoniumsulfat. Sie könnten aber in den verschiedenen wirksamen C-N-Quellen vorkommen. Die folgenden Versuche bezwecken, die Hypothese zu prüfen.

Es soll ferner auch untersucht werden, ob gewisse Metalle oder Metallmischungen, dem ungünstigen Milieu zugefügt, ein Wachstum der Symbiose ermöglichen könnten.

In zweiter Linie wurden Zusätze von pflanzlichen oder tierischen Extrakten dem ungünstigen Milieu zugefügt, um ebenfalls zu prüfen, ob dadurch vielleicht ein Wachstum ausgelöst werden könnte.

Extrakte von Pflanzen, die reich an organischen Säuren sind, könnten vielleicht durch die Säure selbst, als auch durch Metalle, insbesonders durch Spurenelemente, die sie enthalten, denselben Effekt auslösen wie eine künstlich zusammengestellte Metallmischung. Das Gemeinsame der Versuche mit Metallen, Aschensubstanzen von C-N-Quellen und Pflanzenextrakt spiegelt sich darin, indem wir zu zeigen versuchen, dass all den genannten Substraten etwas gemeinsam sein kann, nämlich Metalle oder Metallmischungen, die infolge ihrer katalytischen Wirkung das Wachstum der Symbiose zu beeinflussen imstande sind.

Um den Einfluss, den gewisse Metalle auf das Wachstum der beiden Pilze *Rhodotorula rubra* und *Mucor Ramannianus* ausüben können, besser zu erfahren, wurden systematisch die verschiedensten Elemente des periodischen Systems einer eingehenden Prüfung unterzogen. Es wurden in jeder Versuchsreihe Konzentrationen angewendet, die von 0,01 γ an in Zehnerpotenzen bis zu 1000 γ gesteigert wurden. Die beiden Organismen *Mucor Ramannianus* und *Rhodotorula rubra* wurden einzeln und in Symbiose nach folgendem Schema geprüft:

Mucor Ramannianus + Thiazol ohne Metall
» » + Thiazol mit Metall
» » — Thiazol mit Metall
Rhodotorula rubra + Pyrimidin ohne Metall
» » + Pyrimidin mit Metall
» » — Pyrimidin mit Metall
Symbiose ohne Metall
Symbiose mit Metall.

Die jeweils angewendeten Konzentrationen wurden im Verdünnungsverfahren hergestellt. Die Metalllösung wurde kalt sterilisiert der Nährlösung zugegeben. Es werden nur diejenigen Resultate angeführt, die irgendeine positive Wirkung ergaben.

Die Nährlösung besteht aus : Glukose 4 %, KH_2PO_4 1,5 ‰, $MgSO_4$ 0,5 ‰, KNO_3 oder $(NH_4)_2SO_4$ 1 ‰. Es wird von Fall zu Fall bekanntgegeben, ob die eine oder die andere Stickstoffquelle angewendet wird.

Die Reihenfolge der Elemente entspricht den Gruppen des periodischen Systems.

1. Gruppe : Li, Na, K, Rb, Cs/Cu, Ag, Au.

Wo es möglich war, wurden die Elemente in Form der Chloride beigegeben. Bei dieser ersten Gruppe ist einzig Ag in Form des Nitrates vorhanden.

Die Resultate sind nicht quantitativ vergleichbar, da es nicht möglich war, sämtliche Versuche zur selben Zeit anzusetzen. Das Wachstum entspricht überall einer Periode von über 30 Tagen.

Tabelle 6.

Metalle, die irgendeine positive Wirkung ausüben.

	Konzentration γ	0	0,01	0,1	1	10	100	1000	
Li	Symbiose	0	0,4	1	12	0	0	11	mg
	Mucor Ramannianus + Thiazol	140	160	157	162	162	160	70	mg
Cs	Symbiose	0	22,5	4	4	1	10	0	mg
Au	*Mucor Ramannianus* + Thiazol	130	170	167	167	146	164	149	mg

2. Gruppe : Ca, Sr, Ba, Ra/Be, Mg, Zn, Cd, Hg.

Tabelle 7.

Metalle der Gruppe 2, die einen positiven Einfluss ausüben.

	Konzentration γ	0	0,01	0,1	1	10	100	1000	
Ca	*Mucor Ramannianus* + Thiazol	160	182	164	166	176	166	184	mg
Ra	*Mucor Ramannianus* + Thiazol	175	150	155	185	185	185	185	mg
Be	Symbiose	0	0	0	6	2	0	0	mg
Hg	Symbiose	0	46	32,5	0	0	0	0	mg
	Rhodotorula rubra + Pyrimidin	5	5	28	28	6	5	5	% NW
	Mucor Ramannianus + Thiazol	132	163	172	152	110	142	142	mg

3. Gruppe : B, Al, Tl.

Tabelle 8.
Metalle der 3. Gruppe und ihr positiver Einfluss.

	Konzentration γ	0	0,01	0,1	1	10	100	1000	
Al	Symbiose	0	5	12	1	2	4	76,5	mg
	Rhodotorula rubra + Pyrimidin	2	2	2	3	3	10	37	% NW
	Mucor Ramannianus + Thiazol	176	170	190	164	173	170	194	mg

4. Gruppe : Ti, Th/Sn, Pb.

Tabelle 9.
Einfluss von Sn und Ti auf das Wachstum der Symbiose.

	Konzentration γ	0	0,01	0,1	1	10	100	1000	
Ti	*Mucor Ramannianus* + Thiazol	190	183	198	208	191	132	160	mg
Sn	Symbiose	0	0	10	0	0	0	10	mg

5. Gruppe : V/P, As, Bi.

Phosphor wurde in einem speziellen Versuche geprüft, und nur As lieferte hier positive Resultate.

Tabelle 10.
Der Einfluss von As auf das Wachstum der Symbiose.

	Konzentration γ	0	0,01	0,1	1	10	100	1000	
As	Symbiose	0	0	0	0	0	0	20	mg
	Rhodotorula rubra + Pyrimidin	2	2	2	3	3	4	26	% NW

6. Gruppe : Cr, Mo, W, U.

Tabelle 11.
Der Einfluss von Mo und U auf das Wachstum der Symbiose.

	Konzentration γ	0	0,01	0,1	1	10	100	1000	
Mo	Symbiose	0	0	0	0	4	4	30	mg
U	Symbiose	0	1,2	1,2	8	9,5	1	0	mg

7. Gruppe : F, Cl, Br, J.

Von den Halogenen übte keines einen speziellen Einfluss auf das Wachstum der Symbiose aus.

8. Gruppe : Mn, Fe, Co, Ni/Ru, Os.

Von allen diesen Elementen hatte nur das Fe einen positiven Wachstumseffekt erzeugt.

Tabelle 12.

Einfluss des Fe auf das Wachstum von Mucor Ramannianus.

	Konzentration γ	0	0,01	0,1	1	10	100	1000	
Fe	*Mucor Ramannianus* + Thiazol	182	186	156	188	192	235	250	mg

Nach der Untersuchung von 40 Metallen können dieselben in folgende 3 Kategorien eingeteilt werden :

a) Metalle, die nur das Wachstum der Symbiose fördern und die für die beiden Partner allein unwirksam sind.

b) Metalle, die für die Symbiose als auch für den einen oder den andern Partner einen Wachstumseffekt hervorrufen, sofern ihnen die notwendige Aneurinkomponente zugegeben wird.

c) Metalle, die auf den einen oder den andern Partner wirken, wenn diesem die notwendige Aneurinkomponente zugefügt wird.

Für die Kategorie *a)* haben sich folgende Metalle herausgeschält : U, Mo, Sn, Be, Cs. Diese Elemente der Symbiose, einzeln zugefügt mit KNO_3 als Stickstoffquelle, bewirken ein Wachstum, das aber als sehr schwach zu bezeichnen ist. Mo wird erst bei einer relativ hohen Konzentration wirksam, so dass man ihm nicht mehr die Bezeichnung « Spurenelement » geben kann. Trotzdem diese Salze in reinster Form geliefert werden, müssen sie dennoch andere wirksame Elemente als Beimischung haben. Wenn wir nun absolut reine Substanzen hätten, bei denen nur das gewünschte Element vorhanden wäre, so müssten die Nährlösungen, die man in der Mikrobiologie braucht, ganz andere Zusammensetzungen haben, die einem sehr kompliziert erscheinen würden. « Dank » diesen Spurenelementen, die als Beimischung vorhanden sind, wird dies in den meisten Fällen erspart bleiben. Um zu sehen, wie komplex eine Nährlösung sein kann, führe ich eine Spektralanalyse von Steinberg (4) an, die er von der Pfefferschen Nährlösung ausgeführt hat.

Steinbergs Spektralanalyse von Pfeffers Medium :

Salz	Verunreinigungen
NH_4NO_3	Na, Mg, Ca, K (?).
KH_2PO_4	Al, Pb, Na, Cu, Mg, Ag.
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	Na, Cu.
$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	Fe, B (?), As, Mg, Sn (?), Cu, Si, Na, Mn.
$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$	Fe, Mn, Si, Mg, Cu, Pb.
$MnSO_4 \cdot 2\,H_2O$	Na, Fe, Cu, Al, V, Cr, Si, Mg, Ca.
Na_2MoO_4	Cu, Mn, Fe, Al, Ni, Mg, Ca, K, Na, Mn, Si, Li, V (?).
Dextrose	Li, Na, Sr, Ca, Rb, K, Mn, Al, Fe, Rh, Ni, Ag, Cu, Mg, Sn, B, Si.

Diese Analyse demonstriert eindeutig, wie vielgestaltig die Spurenelemente in den Salzen als Verunreinigungen vorhanden sind.

b) Von den Metallen, die für die Symbiose sowie für den einen oder den andern Partner einen Wachstumseffekt hervorrufen, sind Hg, As, Li und Al zu nennen.

Mit Al erfährt die Symbiose die grösste Wachstumssteigerung. Al übertrifft um ein Vielfaches die erhaltenen Gewichte der andern wirksamen Elemente. Es wirkt aber erst in einer Konzentration von 1000 γ und *es ist sehr wahrscheinlich, dass eben in dieser Konzentration noch andere Spurenelemente ihren Einfluss geltend machen.* Auch *Rhodotorula rubra*, die Nitrate nicht assimilieren kann, kommt mit Al-Zusatz zu einer beträchtlichen Entwicklung, und *Mucor Ramannianus* ergibt ebenfalls ein höheres Trockengewicht.

As ergibt in einer ebenfalls hohen Konzentration ein Symbiosetrockengewicht von 20 mg. Es ist dies gegenüber Al sehr schwach, aber der Einfluss mit derselben Konzentration auf *Rhodotorula rubra* ist mittelstark.

Li gestattet nur ein schwaches Symbiosewachstum, doch macht sich ein Einfluss auf das Wachstum von *Mucor Ramannianus* bemerkbar.

Hg ist für die Symbiose sowie für die beiden Partner von positiver Bedeutung. *Mit Hg gelingt es der Hefe, Nitrate zu assimilieren.*

c) Metalle, die auf den einen oder auf den andern Partner wirken bei Anwesenheit der notwendigen Aneurinkomponente.

Diese letzte Gruppe enthält nur Metalle, die einen Wachstumseffekt auf *Mucor Ramannianus* ausüben und für die Symbiose sowie für *Rhodotorula rubra* von negativer Bedeutung sind. Es handelt sich um die Elemente Au, Ag, Ra, Ca, Fe und Ti. Diese ergeben zum Teil Myzelgewichte, die erheblich höher sind als die Kontrollkulturen. Wenn jedoch kein Thiazol vorhanden ist, so bleibt auch die Metallwirkung aus. *Es dürften demnach irgendwelche direkte oder indirekte physiologische Beziehungen zwischen den Metallen und den Wuchsstoffen herrschen, die aber erst genauer untersucht werden müssen.*

Die hier beobachtete Metallwirkung kann exogener oder endogener Natur sein, oder aber sie kann auch in einer Kombination der beiden bestehen. Diese Frage wird anschliessend untersucht.

Ferner ist es nicht ausgeschlossen, dass einzelne Metalle oder Metallmischungen als Co-Wuchsstoffe funktionieren können.

Interessant ist, dass bei einem grossen Teil der Konzentrationsversuche zwei Maxima auftreten, die in der niederen und in der höheren Konzentration, also als Antipoden anzutreffen sind. Diese sogenannten Sattelkurven wurden auch von L o h m a n n (6) und B o r e s c h beobachtet. Bei G. L o h m a n n handelte es sich um die Kultur von *Aspergillus niger* in Gegenwart von Zink, und als Resultat bekam er eine

sogenannte Sattelkurve mit zwei Maxima. Da die betreffenden Salze im biologischen Sinne eben nicht rein sind, so ist es nicht ausgeschlossen, dass es sich innerhalb der Salzverunreinigung um antagonistische oder aber auch um synergetische Wirkungen handelt, und es wäre gar nicht verwunderlich, wenn sogar Sattelkurven mit mehreren Maxima auftreten würden.

VII. Der Einfluss von pflanzlichen und tierischen Extrakten auf das Wachstum der Symbiose mit anorganisch gebundenem Stickstoff.

Von dem Gedanken ausgehend, dass Extrakte von gewissen Pflanzen reich an Metallen, insbesondere reich an Spurenelementen sein könnten, wurden solche Extrakte von *Echeveria* aus der Familie der Crassulaceen hergestellt. Die Vertreter dieser Familie sind, was organische Säuren anbelangt, reich an solchen, und es muss untersucht werden, ob solche organische Säuren ebenfalls positive Wirkung auf das Wachstum der Symbiose ausüben können, sei es, dass sie an Stickstoff gebunden sind, oder aber sei es, dass sie ebenfalls Spurenelemente enthalten, die eine günstige Wirkung auf das Konsortium auszuüben vermögen.

Spurenelemente spielen im pflanzlichen Organismus bekanntlich eine nicht zu unterschätzende Rolle, insbesondere sind sie für das katalytische System wichtig (B e r t r a n d).

Die *Echeveriapflanzen* waren mir leicht zugänglich und waren zudem noch in genügender Menge zu haben. Sie schienen uns insofern günstig, da sie dicke, saftige Blätter besitzen, die einen Extrakt erhoffen liessen, der unsere Voraussetzungen erfüllen könnte.

Es wurden auch Extrakte tierischer Herkunft hergestellt, und zwar von Organen wie Drüsen usw., die als « Ablagerungsstätte » der verschiedensten Stoffe mineralischer wie organischer Natur bekannt sind. Der Gedanke der Metallwirkung war hier wiederum vorherrschend.

a) Der Einfluss von Pflanzenextrakt.

In Symbiose sind Nitratstickstoff als auch Ammoniumstickstoff zugegen. *Rhodotorula rubra* bekommt jedoch nur das Ammoniumsulfat als N-Quelle und *Mucor Ramannianus* nur das Kaliumnitrat als N-Quelle.

Der Extrakt wird ferner mit Aktivkohle behandelt, um eventuell vorhandene Wuchsstoffe zu adsorbieren.

Was in diesem Experiment wichtig war, ist, dass die Symbiose ohne zugefügtes Extrakt zu keinem Wachstum gelangt, mit Extrakt hingegen zu einem sehr starken. Dies zeigt, dass in betreffendem Extrakt tatsächlich unbekannte Faktoren vorhanden sind, die das Wachstum der Symbiose auslösen. Dass eventuell Aminosäuren das Wachstum auszlösen vermögen, ist fast ausgeschlossen, da ja sämtliche Reaktionen in dieser Richtung negativ ausfielen.

Wird nun der gesamte Extrakt verascht und in salzsaurer Lösung wiederum dem Nährmilieu zugefügt, so gelang das Symbiosewachstum merkwürdigerweise nicht mehr. Es ist nicht ausgeschlossen, dass durch die Veraschung eine Veränderung der Metallkonstellation eingetreten ist, so dass eben die Wirkung nicht mehr dieselbe sein kann wie im ursprünglichen Extrakte.

b) **Der Einfluss von tierischen Extrakten.**

Es wurden Extrakte von *Orchitine* und von *Pancréine* hergestellt. Diese beiden ergaben eine Wachstumssteigerung bei *Mucor Ramannianus* sowie bei *Rhodotorula rubra,* für die Symbiose war jedoch keine positive Wirkung wahrzunehmen. Auch ein Veraschungsversuch in dieser Richtung blieb erfolglos.

VIII. Synergismus und Antagonismus der Spurenelemente.

1. Synergismus.

Unter Synergismus versteht man eine Förderung, welche durch mehrere Faktoren erreicht wird, indem die positive Wirkung jedes einzelnen addiert wird.

Es wird nun versucht, ob eine Metallmischung der positiv wirkenden Elemente einem Synergismus gleichkommt oder nicht.

Die Metallmischung I besteht aus folgenden Elementen :

Urannitrat . .	10 γ	$HgCl_2$	0,01 γ
NH_4-Molybdat .	1000 γ	$CsCl_2$	0,01 γ
$SnCl_2$	0,1 γ	LiCl	1.0 γ
$AlCl_3$	1000 γ		

Die Nährlösung besteht aus : Glukose 4 %, KH_2PO_4 1,5 ‰, $MgSO_4$ 0,5 ‰, KNO_3 1 ‰. Pro 20 ccm Nährlösung wird ein ccm der betreffenden Metallmischung beigefügt. Die Metallmischung wird kalt sterilisiert zugegeben. Die erhaltenen Resultate sind Durchschnittswerte von 10 Kulturen. Die Kulturdauer beträgt 98 Tage.

Tabelle 13.

Einfluss verschiedener Metalle und ihrer Gesamtmischung auf das Wachstum der Symbiose.

Metall	U	Sn	Li	Cs	Mo	Hg	Al	Me I	K
mg Tg	14	15	16	27	40	52	82	167	0

Me I = Metallmischung I.

Wie wir in diesem Versuch gesehen haben, geben die einzelnen Metalle, die hier untersucht wurden, keine allzu hohen Resultate. Ver-

wendet man aber dieselben in einer Mischung von bestimmter Konzentration, so macht sich eine Steigerung des Symbiosetrockengewichtes bemerkbar. Diese Metallmischung scheint demnach synergetisch zu wirken.

In einem andern Versuche, der 40 Tage dauerte, wurde das Wachstumsverhältnis zwischen der Symbiose und den beiden Symbionten

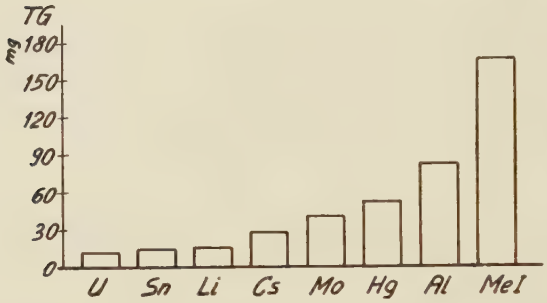


Abbildung 6.
Einfluss einzelner Metalle und ihrer Mischung auf das Wachstum der Symbiose.

untersucht. Die Symbiose ergab ein Trockengewicht von 110 mg. *Rhodotorula rubra* und *Mucor Ramannianus* ohne Aneurinkomponenten kamen trotz dieser Metalle zu keinem Wachstum. Es ist bekannt, dass ja *Rhodotorula rubra* Nitrate nicht zu assimilieren vermag, trotz Pyrimidin- oder Aneurinzusatz. Dieses Nichtassimilierenkönnen von Nitraten haben die Systematiker dazu benützt, Mikroorganismen, je nach Assimilation oder Nichtassimilation von Nitraten in Nitratpositive und Nitratnegative einzuteilen. *Die Metallmischung bewirkt, dass Rhodotorula rubra tatsächlich Nitrate zu assimilieren vermag*, und zwar wird eine Entwicklung von 45 % NW erhalten, was als starkes Wachstum zu taxieren ist. Von diesen Elementen wirkten allein nur das Al und das Hg. Die Entwicklung blieb jedoch unter 40 %, was wiederum zeigt, dass mit der Metallmischung Me I eine zusätzliche Wirkung eintrat. *Mucor Ramannianus* ohne Me I ergab ein Myzelgewicht von 179 mg, mit Me I kam dieses auf 275 mg, was einen Mehrertrag von 53,5 % ausmacht.

Eine positive synergetische Wirkung darf hier als vorhanden bestätigt werden.

2. Antagonismus.

Osterhout (1) kam mit seinen Meerwasseruntersuchungen zu folgendem Schluss: Jedes Salz, welches im Meerwasser enthalten ist, zeigt eine Giftwirkung, wenn es allein in Lösung ist. Eine Mischung dieser Salze in der eigenen Proportion, und die Giftwirkung wird aufgehoben. Die so gemachte Mischung ist eine ausbalancierte physiologische Lösung und ist von grösster Wichtigkeit für Pflanzen und Tiere.

Es frägt sich nun, ob in dem Kapitel « Synergismus » die Wirkung der Metallmischung I als Antagonismus oder als Synergismus zu betrachten ist ? Nach Osterhout geben seine untersuchten Metalle kein besseres Wachstum, weil sie einzeln eine Giftwirkung ausüben, in der Mischung die Giftwirkung jedoch aufgehoben wäre und so eben das Wachstum zustande kommen kann. In meinem Falle vertrete ich die Ansicht, dass es sich bei der Metallmischung I um eine synergetische Erscheinung handelt, indem Katalyse, exogene und endogene Reaktionssteuerungen nebst synergetischen Effekten das Wachstum beeinflussen. Es ist kaum anzunehmen, dass die in der Mischung vorhandenen Metalle, jedes auf jedes, eine entgiftende Wirkung ausübt. Wäre es tatsächlich nur auf Antagonismus zurückzuführen, so müssten auch einzelne Metalle allein eine negative Wirkung auf die beiden Partner, die allein kultiviert sind, ausüben, und dem ist eben nicht so.

Osterhout (1) benützte Meerwasser in seinen Versuchen ausschliesslich, weil es als ausbalancierte Lösung galt. Auf vorhandene Spurenelemente und ihre eventuelle Wirkung wurde in seinen Arbeiten in keiner Weise Bezug genommen.

Bekanntlich stellt Meerwasser eine Quelle dar, die sozusagen alle Elemente enthält, die für den Lebensunterhalt notwendig sind. Mit Sicherheit konnten folgende Elemente darin nachgewiesen werden :

Na, K, Mg, Sr, Li, F, Cl, Br, J, S, Fe, Co, Ni, Si, B, As, Ce, Ba, Al, Sn, Zn, Mn, Cu. Pb, Ag, Au, Bi, Cs, Mo, Ti, Ge, Rb, V (Freundler) (Wattenberg).

Schopfer und Utiger konnten zeigen, dass *Phycomyces-bl.*-Kulturen durch einen Zusatz von Meerwasser, das aus dem Adriatischen Meer (Golf von Triest, 1941) bezogen wurde, gegenüber Kontrollkulturen ohne solches einen Myzelmehrertrag von 157 % ergaben, was beweist, dass die im Meerwasser enthaltenen Elemente das Wachstum günstig beeinflussen können.

Vermag nun solches Meerwasser auch einen günstigen Einfluss zu haben auf das Wachstum der Symbiose, welche in ungünstigem Milieu kultiviert wird? Folgender Versuch wird uns darüber Aufschluss geben.

Tabelle 14.
Einfluss von Meerwasser auf das Wachstum der Symbiose.

Meerwasser ccm/20 ccm	1	3	5	0	
Symbiose	0	63	35	0	mg
Mucor Ramannianus + Thiazol	161	159	—	118	mg

Die Entwicklungsdauer der Symbiose betrug 95 Tage und diejenige des *Mucor Ramannianus* 33 Tage. Als Stickstoffquelle diente Kalium-

nitrat, und das Meerwasser wurde jeweilen kalt sterilisiert zur Nährlösung gegeben. Das Meerwasser übt tatsächlich auf das Symbosewachstum einen positiven Einfluss aus. Die Maximalentwicklung wird bei einem Zusatz von 3 ccm/20 ccm Nährlösung erreicht, nachher erfolgt wieder ein Abfall der Wachstumskurve. Auf die Entwicklung von *Rhodotorula rubra* übte es keine Wirkung aus, da der Kontrollversuch und die

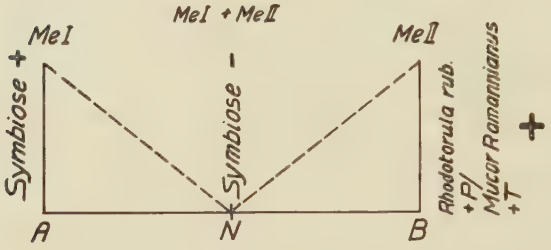


Abbildung 7.
Symbiose und antagonistische Wirkung zwischen Me I und Me II.

geprüften Konzentrationen dieselbe Entwicklung gaben. *Mucor Ramannianus* hingegen erreicht gegenüber seiner Kontrolle ein höheres Myzelgewicht, was auf die zusätzlichen Elemente, die das Meerwasser enthält, zurückzuführen ist. Da wir es mit einer ausbalancierten Lösung zu tun haben, so hätte man erwarten dürfen, dass auch das Wachstum der Symbiose höhere Resultate ergeben würde. In diesen Versuchen handelt es sich darum, eine Lösung zu finden (wie sie auch gefunden wurde), die der Physiologie und dem Stoffwechsel der Symbiose gerecht wird.

In einem weiteren Versuche wird eine Metallmischung II zubereitet, deren Elemente einzeln, im Beisein eines Wachstumsfaktors, eine Förderung des Wachstums des einen oder des andern Symbionten ergaben. Die Mischung Me II enthält pro ccm folgende Elemente :

$AuCl_3$	0,1 γ	$FeCl_3$	0,01 γ
$AgNO_3$	100,00 γ	NaCl	0,01 γ
$CaCl_2$	0,01 γ	Th	10,00 γ
H_3BO_4	0,01 γ	Tl	0,01 γ
		Sr	0,01 γ

Geben wir nun der Lösung Me I die Lösung Me II bei, so erfolgt keinerlei Wachstum der Symbiose mehr. Hier herrscht ein Antagonismus zwischen den beiden Lösungen, indem die Wirkung der einen die Wirkung der andern aufhebt.

Bekanntlich gehört das Kalium zu den unentbehrlichen Elementen im Pflanzenreich. In den Kaliumverbindungen ist aber auch fast ohne Ausnahme das Natrium immer vertreten, so dass man manchmal tatsächlich nicht sagen kann, ob eine Hauptwirkung dem Kalium oder der Natriumverunreinigung zuzuschreiben ist. In den Metallversuchen wurde nun auch geprüft, in was für Konzentrationen das Kalium noch wirksam ist. Die Nährlösung ist die gewöhnliche. An Stelle des KNO_3 tritt

das $NaNO_3$, und KH_2PO_4 wurde in variabler Konzentration beigefügt. Die Versuchsdauer beträgt 38 Tage.

Tabelle 15.
Variabilität der KH_2PO_4-Konzentration und ihr Einfluss auf das Wachstum der Symbiose und das der beiden Symbionten.

Konzentration γ	0	0,01	0,1	1	10	100	1000	
Symbiose	24	15	17	15	11	20	0	mg
Mucor Ramannianus + Thiazol	15	20	24	29	20	30	50	mg

Die Symbiose kommt in der Kontrollkultur, wo kein KH_2PO_4 vorhanden ist, zu einem schwachen Wachstum. Dieser Wachstumseffekt erhält sich noch bis zu einer Konzentration von 100 γ, um bei 1000 γ sofort wieder auf Null zu sinken. Dieses Verhalten zeigt, dass zwischen Kalium und Natrium oder aber zwischen Kalium und Phosphat antagonistische Beziehungen herrschen müssen. Je stärker die Kaliumphosphatkonzentration, um so weniger gelingt es der Symbiose, mit Nitrat sich zu entwickeln. Bei *Mucor Ramannianus* ist dies anders, ohne Kalium kommt er nur zu einer spärlichen Entwicklung, die mit fortschreitender Konzentration aber zunimmt, wobei eine maximale Entwicklung seinerseits bei einer Konzentration des Kaliums von weit über 1000 γ zu sein scheint. Das Natriumnitrat ist aber auch nicht frei von Kalium, was schon mit der Flammenfärbung zu sehen ist, folglich gelangt die Kontrollkultur noch zu einer Entwicklung. Um diese antagonistischen Effekte zwischen Kalium, Phosphat und Natrium genauer kennenzulernen, werden weitere Versuche unternommen, die einmal das Kalium und ein andermal das Phosphat eliminieren.

Es wurde in folgender Nährlösung, unter Weglassung des Kaliums, experimentiert: Ammoniumnitrat tritt an Stelle des Kaliumnitrates, und Natriummetaphosphat wurde in variabler Konzentration beigefügt.

Tabelle 16.
Der Einfluss von Natriummetaphosphat auf das Wachstum der Symbiose und das der beiden Symbionten.

Konzentration γ	0	0,01	0,1	1	10	100	1000	
Symbiose	0	0	0	0	0	70	0	mg
Mucor Ramannianus + Thiazol	0	0	0	0	10	40	90	mg
Rhodotorula rubra + Pyrimidin	8	10	10	10	21	46	47	% NW

Die Ausschaltung des Kaliums und die Einführung des Natriumphosphates führt noch zu höheren Resultaten. Bei 1000 γ erreicht die Symbiose 70 mg und ist also bedeutend höher als nur mit Kalium. Da

das Natrium, wie schon gesagt, nicht kaliumfrei ist, so muss dieser positive Effekt dem Phosphat zugeschrieben werden. *Mucor Ramannianus* kommt ebenfalls zu höherem Myzelgewicht und, was eigentlich noch erstaunlicher ist, ist das, dass es *Rhodotorula rubra* gelingt, mit 100 γ Natriumphosphat Nitrat zu assimilieren, hingegen mit Kaliumphosphat tritt dieser Fall nicht ein. Es muss sich hier also um einen Antagonismus zwischen Kalium, Natrium und Phosphat handeln. Es scheint also, dass das Kalium in viel kleinerer Konzentration da sein muss als das Natrium, dass die Kaliumverunreinigung des Natriumsalzes die besseren Resultate liefert als die Natriumverunreinigung des Kalisalzes.

In einem weiteren Versuche wurde das Phosphat weggelassen und das Kalium in Form von Nitrat in variabler Menge zugegeben. Als Stickstoffquelle wird Ammoniumnitrat verwendet.

Weder die Symbiose noch *Mucor Ramannianus*, noch *Rhodotorula rubra* kamen zu irgendwelchem Wachstum.

IX. Spezielle Metallversuche.

1. Der Versuch mit Natriummetaphosphat unter Ausschaltung des Kaliums hat, ohne dass eine Metallmischung hinzugefügt worden wäre, ziemlich gute Resultate geliefert. Es wird folgende Nährlösung angewendet: Glukose 4 %, $(NH_4)_2SO_4$ 1 ‰, Na-Metaphosphat 1,5 ‰, $MgSO_4$ 0,5 ‰. Infolge der Anwesenheit von Ammoniumsulfat wird gepuffert nach Mc Ilvaine. Die Nährlösung und die Pufferlösung werden je doppelt konzentriert gemacht und dann von beiden Lösungen je 10 ccm genommen. Anfangs-pH = 4,6. Die Kulturdauer beträgt 87 Tage (Symbiose), die des *Mucor Ramannianus* 37 Tage und diejenige von *Rhodotorula rubra* ebenfalls 37 Tage.

Tabelle 17.

Einfluss der Metallmischung Me I in variabler Konzentration auf das Wachstum der Symbiose in gepuffertem Milieu.

Konzentration Me I ccm/20 ccm	0	0,01	0,1	0,2	0,5	1	2	
Symbiose	0	65	49	62	59	53	54	mg
Mucor Ramannianus + Thiazol	65	62	62	62	59	61	66	mg
Rhodotorula rubra + Pyrimidin	54	54	56	61	62	62	62	% NW

Wir sehen, dass in dieser Untersuchung die Metallmischung keinen merklich grossen Einfluss ausübt, weder auf die Symbiose noch auf die beiden Symbionten. Allerdings ist hier die Natriumphosphatkonzentration merklich grösser und erlaubt der Symbiose in dieser Konzentration

kein Wachstum mehr. Mit der Metallkonstellation kann ein Effekt erzielt werden, der aber noch kleiner ist, als wenn keine Metalle vorhanden wären, wenn das Natriumphosphat nur in einer Konzentration von 100 γ zugegen ist. Wahrscheinlich üben die Metallverunreinigungen der Pufferlösung auch einen Effekt aus, der vielleicht entgegengesetzt der Me I wirkt und eine teilweise Neutralisation erzielt.

2. Einfluss der Metallmischung Me I in nicht gepuffertem Milieu auf das Wachstum der Symbiose, die KNO_3 als N-Quelle zur Verfügung hat.

Tabelle 18.

Metallmischung Me I, nicht gepuffert, in variabler Konzentration und der Einfluss derselben auf das Symbiosewachstum, in Gegenwart von Nitrat.

Metallmischung Mc I ccm/20 ccm	0	0,01	0,1	0,2	0,5	1	2	
Symbiose	0	4	50	17,5	72	162	29	mg
Mucor Ramannianus + Thiazol	148	161	157	164	136	129	99	mg
Rhodotorula rubra + Pyrimidin	6	9	15	21	32	50	60	% NW

Die Versuchsdauer für die Symbiose betrug 87 Tage, für *Mucor Ramannianus* und für *Rhodotorula rubra* hingegen nur 38 Tage.

Die Maximalentwicklung der Symbiose wird bei einer Konzentration von 1 ccm erreicht, *Rhodotorula rubra* kommt bei 2 ccm und *Mucor Ramannianus* bei 0,2 ccm zur Maximalentwicklung. Wir sehen, dass die verschiedenen Versuchsserien in verschiedenen Konzentrationen Höchstresultate ergeben, was darauf zurückzuführen ist, dass innerhalb der Metallmischung, je nach der Gesamtkonzentration, in der sie angewendet wird, die mannigfaltigsten Kombinationen von antagonistischen und synergetischen Effekten auftreten können.

3. Einfluss der Metallmischung Me I in gepuffertem Milieu, in Gegenwart von Ammoniumsulfat als N-Quelle, auf das Symbiosewachstum.

Tabelle 19.

Metallmischung Me I in Gegenwart von Ammoniumsulfat, gepuffert, und ihr Einfluss auf das Symbiosewachstum.

Metallmischung Me I ccm/20 ccm	0	0,01	0,1	0,2	0,5	1	2	
Symbiose	194	204	210,5	206	200	193	200	mg
Mucor Ramannianus + Thiazol	168	168	129	159	110	141	126	mg
Rhodotorula rubra + Pyrimidin	80	81	84	78	78	76	74	% NW

Der angewendete Puffer ist nach Vorschrift von Mc Ilvaine. Anfangs-pH = 4,6.

In diesen Versuchen treten zwischen den Kontrollkulturen und denen mit der Metallmischung sozusagen keine Unterschiede auf, im Gegensatz zum Versuch 1, wo die Kontrolle der Symbiose 0 war und die Metalle immerhin einen gewissen Einfluss auf das Wachstum derselben ausübten. Im Versuch 1 wurde Natriummetaphosphat angewandt und in diesem hier sek. saures Kaliumphosphat. Die Pufferung war die gleiche, und die Resultate sind Mittelwerte von je 5 Kulturen. Es scheint, dass im Versuch 3 die Metalle, die als Spurenelemente vorhanden sein werden, mit der Nährlösung diese Equilibriertheit besitzen, die nötig ist, um ein Wachstum der Symbiose zu ermöglichen.

Mit all diesen verschiedenen Metallversuchen ist eines klar geworden, dass man hier nach der Kombinatorik vorgehen muss, um die besten Resultate zu bekommen. Es mag wie ein Zufall erscheinen, dass in einem gewöhnlichen Nährmedium mit der Metallösung Me I gerade eine maximale Entwicklung sich gezeigt hatte.

X. Reinigung der Nährlösung von Spurenelementen mit « Carbo medicinalis Merck ».

Nachdem Steinberg (2) durch Spektralanalyse der Pfeffer-schen Nährlösung gezeigt hatte, wie komplex dieselbe mit Spurenelementen verunreinigt ist, geht er dazu über, die Nährlösung zuallererst von Spurenelementen zu befreien, so gut dies eben möglich ist. Steinberg (3) hat hierfür eine Methode vorgeschlagen, die darin besteht, dass Spurenelemente mit Kalziumkarbonat oder mit basischem Magnesiumkarbonat niedergeschlagen werden.

G. Lohmann zeigte in der Arbeit mit *Aspergillus niger*, dass seine Nährlösung ebenfalls Metallspuren enthalten könnte und versuchte, dieselben mit einer Kohlebehandlung (Carbo medicinalis Merck) daraus zu entfernen. Die Nährlösung muss aber schwach alkalisch sein, ansonst bei saurem pH Ionen in die Nährlösung, von der Kohle kommend, hineindiffundieren könnten. Seine Resultate seien hier wiedergegeben :

Kohlebehandlung/Tage	1	2	2,5	4	5
mg Trockengewicht . .	195	81	19	10	226

Am 5ten Tag ist das pH bereits ins saure Gebiet verlegt worden, und es gingen schon adsorbierte Metallspuren wieder in Lösung. Es können aber auch bei pH alkalisch Ionen in Lösung gehen, die in der Kohle enthalten sind.

Je nach der Anwendung von Kulturgläsern mit verschiedenen Glassorten können die Resultate ebenfalls beeinflusst werden. Steinberg (1) zeigte in seinem Versuch, dass vom Jenaer Glas aus Zn-Ionen in die Nährlösung abgegeben werden (Ondratschek [1]).

Es ist eben sehr schwierig, eine vollständig reine Nährlösung herzustellen, denn die Faktoren, die zu einer Verunreinigung mit Spurenelementen führen, können nicht vollständig ausgeschaltet werden.

In meinem Reinigungsversuche wurde einmal nur das aq. dest., dann das aq. dest. mit der Zuckerlösung, mit Kohle behandelt. Es scheint, dass nämlich die meisten Verunreinigungen vom Zucker her kommen.

Die zu behandelnde Lösung wurde mit 5 % Carbo medicinalis « Merck » vermischt, das Ganze während einer halben Stunde auf 50° C gelassen und nachher abfiltriert. Es ist zu beachten, dass das pH zwischen 4,0 und 6,5 variiert.

1. Versuch : Aqua dest. nicht mit Kohle behandelt :

N-Quelle	Kontrolle	Symbiose + Me I
KNO_3	2	165,5 mg
$(NH_4)_2SO_4$	191	184 mg
gepuffert, McIlvaine, pH = 4,2		

2. Versuch : Aqua dest. mit Kohle behandelt :

N-Quelle	Kontrolle	Symbiose + Me I
KNO_3	16	54 mg
$(NH_4)_2SO_4$	120	159 mg
gepuffert, McIlvaine, pH = 4,2		

3. Versuch : Aqua dest. + Zuckerlösung mit Kohle behandelt :

N-Quelle	Kontrolle	Symbiose + Me I
KNO_3	0	7,5 mg
$(NH_4)_2SO_4$	0	6 mg
gepuffert, McIlvaine, pH = 4,2		

Der Versuch 1 dient als Kontrolle. Wir sehen, dass für das Nitratmilieu die Metallmischung I zugegeben werden muss, damit ein Wachstum stattfinden kann. Mit Ammoniumsulfat scheint es, dass die Metall-

verunreinigungen des Puffers genügen, um ein Wachstum der Symbiose zu ermöglichen.

Im Versuch 2 wurde das aq. dest., in welchem sämtliche Salze gelöst werden, mit Kohle behandelt. Die Kontrolle ist schwach positiv mit Nitrat, und die Symbiose ergibt ein bedeutend kleineres Wachstum als in Versuch I. Auch mit Ammoniumsulfat sind die erhaltenen Myzelgewichte bedeutend kleiner als im Versuch I. Auf alle Fälle scheint das Wachstum der Symbionten in mit Kohle behandeltem aq. dest. gehemmt. Es stellt sich nun die Frage, sind Ionen aus der Kohle in die Nährlösung hineindiffundiert, oder aber hat die Kohlebehandlung die Metallverunreinigungen adsorbiert, so dass die Wirkung herabgesetzt wird ?

Im Versuch 3 sind die Wachstumshemmungen noch krasser. Hier findet selbst kein Wachstum mehr statt, da, wo die Pufferlösung vorhanden ist und wo selbst im Versuch 2 noch ziemlich starke Myzelgewichte erhalten wurden. Es scheint tatsächlich, dass der Zucker bedeutende Metallverunreinigungen enthält, wie dies schon Steinberg geäussert hatte. Es ist unwahrscheinlich, dass Metallionen aus der Kohle in die Nährlösung hineindiffundieren, ansonst wäre das Wachstum der Symbiose immerhin noch positiv, wie es der Versuch 2 gezeigt hat. Es scheint, dass eine so kurze Behandlung des aq. dest. mit Kohle genügt, um die nötige Adsorption von vorhandenen Metallionen zu garantieren. G. Lohmann erreichte dieses Nullstadium erst nach einer Behandlung von vier Tagen. Im Versuch 3 betrug die Glukosekonzentration nach der Kohlebehandlung schätzungsweise 4 %.

Kulturgläser geben Metallionen in das Nährmilieu ab, das aq. dest. enthält ebenfalls Metallspuren, die angewendeten chemischen Substanzen, wie Salze und Zucker, enthalten wiederum Spurenelemente als Verunreinigungen. Werden Pufferlösungen angewendet, so enthalten auch diese wiederum Metalle in Form von Spurenelementen. Diese sämtlichen Faktoren tragen dazu bei, dass eine Kultur von Mikroorganismen zustande kommen kann. Sie müssen sozusagen vorhanden sein, ansonst man gezwungen wäre, solche Spurenelemente der Nährlösung beizufügen.

XI. Der Einfluss von Metallen auf die Assimilation von Stickstoff.

Wir haben gesehen, dass die Symbiose bis jetzt nur in solchen Stickstoffverbindungen zur Entwicklung gelangt, die Kohlenstoff und Stickstoff in derselben Verbindung enthielten. Ausgenommen natürlich diejenigen Fälle, wo wir eine künstliche Metallmischung mit positivem Erfolg anwandten.

Von einigen solchen Verbindungen wurden Veraschungen gemacht und davon ein salzsaurer Auszug hergestellt und dieser der Symbiose

in einem ungünstigen Stickstoffmilieu zugefügt. Die jeweils angewandten Aschelösungen entsprechen einer Stickstoffkonzentration von 1‰.

Es wurde die gewöhnliche Nährlösung verwendet mit $(NH_4)_2SO_4$ 1‰ als Stickstoffquelle.

Die Metallmischung 1, die, auf Nitrat, das Wachstum der Symbiose ermöglichte, ergab mit Ammoniumsulfat ein negatives Resultat.

Wenden wir verschiedene Pufferlösungen an, so gelingt es, die Symbiose mit Ammoniumsulfat zur Entwicklung zu bringen. Es dürfte sich hier nicht nur wegen der hierzu notwendigen Einstellung der Wasserstoffionenkonzentration handeln, sondern die Metallverunreinigungen, die in den betreffenden Pufferlösungen sein werden, mögen das Notwendige zum Gelingen ebenfalls beitragen.

Die Kulturdauer der Versuche beträgt 51 Tage.

Resultate: Kontrolle		0
Mit Glutaminsäureasche	Symbiose TG mg	75
» Asparaginasche	»	95
» Glykokollasche	»	105

Wir entnehmen aus diesen Resultaten, dass die Symbiose mit Ammoniumsulfat und dem Zusatz der betreffenden Aschen tatsächlich zu einem guten Wachstum gelangt. Die erhaltenen Werte sind die Mittel aus je 5 Kulturen. Der Anfangs-pH der Nährlösung betrug 4,6 und der End-pH 3,3. Fügen wir keine Asche hinzu, so erfolgt auch keinerlei Wachstum, und der pH wird nach 3,0 verschoben. Demnach müssen die Metalle noch eine spezielle Funktion ausüben, was die Aufnahme des Stickstoffs anbelangt, auch, indem die Wasserstoffionenkonzentration durch Metalle beeinflusst werden kann, wie das die erhaltenen Resultate demonstrieren. Werden dieselben Aschen in Nitratnährlösung gebracht, so wird ebenfalls kein Wachstum der Symbiose erzeugt. Es scheint, dass für die Nitrat- sowie für die Ammoniumstickstoffassimilation verschiedene Metalle verantwortlich gemacht werden müssen. Es kann sein, dass die Wirkung, die die verschiedenen Metalle mit verschiedenen Stickstoffquellen erzielen, nicht nur eine rein exogene Angelegenheit ist, sondern dass die Plasmagrenzschichten durch sie noch speziell beeinflusst werden.

Sakamura (1) fand 1930, dass die Resorption von Ammonium- und Nitratstickstoff durch Substanzen, die aus dem Myzel diffundieren, beeinflusst werden kann. Die pH-Aenderung in den Kulturen von *Aspergillus oryzae* sind nach Sakamura (2) von der Art der Impfung abhängig, und zwar erhöht sich die Azidität stärker, wenn die Konidien mit einer Platinöse aus der Kultur entnommen werden, als wenn mit einer Konidiensuspension geimpft wird, die durch Einfüllen destillierten Wassers in ein Kulturröhrchen gewonnen wurde. Sakamura folgert,

dass bei dem zweiten Verfahren eine Substanz, die auf die Resorption von NH_3 und NO_3 einwirkt, aus dem Agarboden oder der Myzeldecke in das aq. dest. diffundiert. Diese Substanz würde die Ammoniophilie herabsetzen und eine Förderung der Nitratresorption bedingen. Sakamura (2) fand weiter, dass durch Zusatz von Schwermetallen zur Nährlösung die « Ammoniophilie oder Nitratophilie » beeinflusst werden. Auf Grund der beobachteten pH-Aenderungen in der Nährlösung bei Zusatz von Fe trat baldige Erniedrigung der Azidität der Kulturlösung ein, ein Zusatz von Cu bewirkte einen Anstieg der H-Ionenkonzentration. Auf Grund dieser gemachten Beobachtungen zog Sakumara Rückschlüsse auf die ungleich starke oder schwache Aufnahme von Nitrat.

In seinen neuesten Untersuchungen mit *Aspergillus oryzae* fand Sakamura, dass gewisse Metalle den pH so beeinflussen, dass dieser zuerst nach einer Richtung verschoben wird, um dann aber an einem speziellen Punkte wieder in entgegengesetzter Richtung zu gehen. Sakamura (3) spricht von einer pH-Umkehr.

Fe soll für *Aspergillus oryzae* in grosser Menge die Absorption von Nitrat bewirken. Zn in einer Konzentration unter 10^{-6} mol soll eine pH-Umkehr hervorrufen, aber über 10^{-6} mol verschiebt dieses Metall den pH-Wert einseitig.

Mit Glukose als C-Quelle sank der pH-Wert immer niedriger bis auf 2,0, während die pH-Umkehr im Moment geschah, wo Fruktose oder Saccharose zur Verwendung gelangten. Fe ruft ebenfalls eine Umkehr des pH hervor, während Cu dies verhindert.

Kulturen mit Glukose bedingten hauptsächlich Nitrataufnahme, und mit Ammoniumkulturen konnte dieser Effekt mit Glukose nicht erzielt werden. Durch Vermehrung der Schwermetalle in der nötigen Menge wurde das Pilzwachstum gefördert und die pH-Erniedrigung bei der Ammoniakkultur und die pH-Erhöhung bei der Nitratkultur beschleunigt.

Die demonstrierten Versuche Sakamuras und seine erhaltenen Resultate sind in gewissen Parallelen mit meinen Resultaten, obwohl mir die Arbeiten Sakamuras erst am Schlusse meiner Arbeit bekannt wurden. Die von Sakamura gemachten Erfahrungen mit *Aspergillus oryzae* betreffs Nitrat- oder Ammoniumassimilation können durch meine Versuche eine Bekräftigung erfahren, um so mehr, nicht mit den gleichen Pilzen gearbeitet wurde.

Es wurde hierauf ein weiterer Versuch angesetzt mit 15 andern Aminosäuren, die verascht und nachher der Symbiose zugegeben wurden. Diese Aminosäuren konnten aber nur in bedeutend kleineren Konzentrationen angewandt werden (0,15—0,5 ‰) und gaben alle negative Resultate. Es ist nicht ausgeschlossen, dass eben diese kleineren Kon-

zentrationen die Metallverunreinigungen nicht in den Konzentrationen enthalten, in denen sie für die Symbiose notwendig sind.

Fügen wir Asparaginasche und Harnstoffasche einer gepufferten Nährlösung zu (Mc Ilvaine, 4, 2), so erreicht man noch höhere Myzelgewichte.

	Kontrolle TG mg 93,7	
Asparaginasche	Symbiose	175
Harnstoffasche	»	175

Es wurde schon angetönt, dass der Puffer selbst mit Metallen verunreinigt sein könnte und dass daher ein Wachstum mit Ammonsulfat möglich ist, dass es eben nicht nur die Pufferwirkung ist, die das Wachstum der Symbiose mit Ammonsulfat ermöglicht, sondern dass dies zum grössten Teil durch die Metalle geschieht. Die Veraschungen einiger C-N-Verbindungen zeigten eindeutig, dass, sobald die Aschelösung der Symbiose beigefügt wird, ein Wachstum mit Ammonsulfat möglich wird, trotzdem das Milieu ziemlich angesäuert wird.

Für kommendes Experiment soll uns ein Weinsäure-Natriumtartrat-Puffer dienen. Es werden 3 Serien angesetzt: Die Asche von Weinsäure allein, diejenige von Natriumtartrat allein und beide zusammen. Die Aschenlösungen wurden in der Konzentration der Pufferstärke zugefügt.

1. Weinsäureasche	Symbiose TG mg	0
2. Natriumtartratasche	»	133
3. Weinsäureasche + Natriumtartratasche	»	173

Diese Versuche sind in ungepuffertem Milieu mit Ammoniumsulfat ausgeführt worden. Die Kulturdauer betrug 53 Tage, und die Resultate sind Mittelgewichte aus je 6 Kulturen.

Unsere Vermutung hat sich bestätigt. Veraschen wir einen Puffer, geben seine Aschelösung der Symbiose mit Ammonsulfat bei, so erfolgt mit Weinsäureasche kein Wachstum, ebenso ist die Kontrolle negativ. Mit Natriumtartratasche wird eine sehr starke Entwicklung der Symbiose erhalten, und geben wir beide Aschelösungen zusammen, so wird ein noch höheres Myzelgewicht erhalten.

Dieser Veraschungsversuch dürfte eindeutig beweisen, dass es nicht die Pufferung allein unserer Nährlösung ist, die ein Wachstum der Symbiose ermöglicht oder nicht, sondern dass es die Spurenelemente sind, die in den Puffersubstanzen als Verunreinigungen vorkommen, die den positiven Effekt des Symbiosewachstums auslösen. Die Pufferwirkung ist hier sekundärer Natur, und die primäre Wirkung ist diejenige der Metallverunreinigungen.

XII. Wachstumsgeschwindigkeit der Symbiose in den verschiedenen Nährmilieus.

Die Symbiose, die in Asparagin oder in einer andern C-N-Quelle kultiviert wird, erreicht am schnellsten eine maximale Entwicklung. Nehmen wir an Stelle des Asparagins ein Nitrat, so erfolgt kein Wachs-

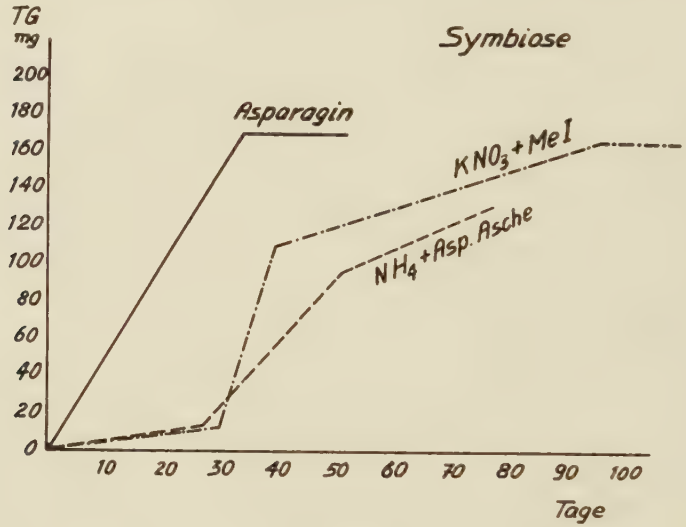


Abbildung 8.
Wachstumsintensität der Symbiose in verschiedenen Nährmilieus.

tum. Fügen wir aber dem Nitrat die Metallmischung I hinzu, so ist die Entwicklung der Symbiose gesichert. Während mit Asparagin schon in den ersten 5 Tagen das Symbiosewachstum zu erkennen ist, braucht es mit Nitrat und der Metallmischung annähernd 30 Tage. Von diesem Moment an entwickelt sie sich rasch und erreicht nach ungefähr 100 Tagen, was man mit Asparagin schon in 35 Tagen bekommt. Steht als N-Quelle eine Ammoniumverbindung zur Verfügung, so erfolgt ebenfalls keine Entwicklung der Symbiose. Fügen wir die Asche von Asparagin hinzu, so entwickelt sie sich, aber noch viel langsamer als mit Nitrat und Me I.

Vergleichen wir die Wachstumskurven, so stellen wir fest, dass ohne Zugabe von Asparagin oder einer andern C-N-Quelle fast dreimal soviel Zeit verstreicht, bis dieselbe Entwicklungsstufe erreicht werden kann. Geben wir der Symbiose C und N in getrennten Verbindungen, so braucht das Wachstum fast dreimal soviel Zeit, als wie wenn die beiden gemeinsam in organischer Verbindung gegeben werden. Dieses ver-

zögerte Wachstum in anorganischen Stickstoffverbindungen zeigt, dass infolge einer Mehrsynthese die maximale Entwicklung auch erst später erreicht wird. Die Tatsache, dass ohne Zufügung von Metallen zu anorganischen N-Verbindungen Synthesen nicht stattfinden können, mutet wie ein Syntheseverlust an. Höchstwahrscheinlich sind diese Metallverunreinigungen als Katalysatoren notwendig für die Auswertung der dargebotenen organischen Substanzen, wie auch für die Synthese der Wuchsstoffe.

XIII.

A. Besprechung der Resultate.

Schopfer (5) stellte fest, dass die Hefe *Rhodotorula rubra* ein Mikroorganismus ist, der zu seiner Entwicklung nur die eine Spaltungshälfte des Aneurinmoleküls, nämlich das Pyrimidin, benötigt.

Schopfer (4) konnte ferner mit Hilfe des *Phycomycestestes* nachweisen, dass derselbe Mikroorganismus die andere Aneurinhälfte, das Thiazol synthetisiert, und mit dem Phytophthoratest, dass das ganze B^1 mol synthetisiert war.

Müller und Schopfer, die mit *Mucor Ramannianus* experimentierten, kamen zu der Feststellung, dass diese Mucorinee sich gerade umgekehrt verhält wie die *Hefe*. *Mucor Ramannianus* braucht zu seiner Entwicklung ebenfalls nur eine Aneurinhälfte, nämlich das Thiazol, und er ist imstande, das Pyrimidin zu synthetisieren.

Müller (1, 2) versuchte nun beide Organismen zusammen zu kultivieren, ohne dass er irgendwelche Aneurinkomponente hinzugab. Das Experiment gelang. Mit Asparagin als N-Quelle entwickeln sich beide Pilze, indem jeder eine Aneurinhälfte synthetisiert, und die andere bekommt er von seinem Partner. Sie bilden so eine künstliche Symbiose.

Diese künstliche Symbiose ist ein indirekter Beweis, dass *Rhodotorula rubra* das Thiazol und *Mucor Ramannianus* das Pyrimidin synthetisiert, ansonst diese Symbiose nicht zustande kommen würde.

Ich hatte nun die Aufgabe, diese Symbiose eingehender zu studieren.

Bei der Untersuchung der verschiedenen N-Quellen stellte ich fest, dass wenn der Symbiose eine anorganische Stickstoffquelle zur Verfügung steht, sich überhaupt keinerlei Wachstum einstellt (Seite 548). Ist jedoch eine organische N-Quelle vorhanden, so erfolgt sofort wieder ein Wachstum der beiden Partner in Symbiose.

Mucor Ramannianus wie auch *Rhodotorula rubra* sind imstande, mit der zugehörigen Aneurinkomponente anorganisch gebundenen Stickstoff zu assimilieren [$(NH_4)_2SO_4$].

Es musste nun untersucht werden, warum eine anorganische N-Quelle kein Wachstum der Symbiose ermöglicht und nur eine organische N-Quelle.

In einer organischen N-Verbindung haben wir den Stickstoff und den Kohlenstoff beieinander, nicht so in einer anorganischen N-Verbindung. Vielleicht gelingt es den beiden Organismen nicht, Stickstoff aus anorganischer Verbindung mit Kohlenstoff zu binden, und somit wäre auch eine Wuchsstoffsynthese ausgeschlossen.

Eine Arbeitshypothese war folgende: Wenn die beiden Pilze zu ihrer Wuchsstoffsynthese unbedingt eine C-N-Quelle haben müssten, so würde eine C-N-Verbindung, in Wuchsstoffkonzentration einem ungünstigen Nährmilieu [mit $(NH_4)_2SO_4$] beigefügt, das Wachstum ermöglichen. Es zeigte sich aber, dass der Versuch negativ ausfiel, indem schon eine grosse Konzentration einer C-N-Verbindung (1000—10 000 γ) vorhanden sein musste, um eine Entwicklung zu garantieren (Seite 552).

Geben wir wiederum eine C-N-Quelle in Form von Ammoniumtartrat, Ammoniumcitrat (Seite 548) *usw., so ist die Symbiose wachstumsfähig. Fügen wir aber das Ammoniumsalz inklusive einer organischen Säure, aber beide getrennt, der Symbiose zu, so erfolgt in Ammonsulfat wiederum kein Wachstum* (Seite 554).

Es wurde nun vermutet, dass Metalle, als Verunreinigungen, katalytisch wirkend, hier einen Einfluss haben könnten.

Hierauf stellte ich systematische Untersuchungen mit einer grossen Anzahl von Metallen an (Seite 554). Dieselben wurden in verschiedenen Konzentrationen, kalt sterilisiert, einem ungünstigen Milieu (NH_4- oder NO_3-Salz) beigefügt.

Mit Ammoniumsulfat als N-Quelle wurden lauter negative Resultate erhalten. Auch Metallmischungen hatten hier keinen Erfolg.

Der pH einer anorganischen NH_4-Verbindung, der anfangs 4,6 war, ergab nach wenigen Tagen schon mit der Symbioseimpfung eine Ansäuerung und blieb bei pH 3,0 stehen. Nach gemachten pH-Untersuchungen ist hier kein Wachstum mehr zu erwarten, und man wäre geneigt zu glauben, dass dies nur eine pH-Frage wäre.

Veraschen wir aber eine C-N-Quelle (Asparagin, Glutaminsäure, Glykokoll) und fügen die Aschenlösungen einem Nährmilieu mit Ammoniumsulfat als N-Quelle zu, so können wir mit Erstaunen feststellen, dass das Wachstum der Symbiose nun plötzlich gelingt. Die Aschenkonzentration entspricht einer 1‰igen C-N-Verbindung (Seite 571). *Es handelt sich hier also tatsächlich um eine Metallwirkung, und zwar von Elementen, die nur in Spuren in den betreffenden organischen Verbindungen als Verunreinigungen vorkommen.*

Wird eine Nährlösung mit Ammoniumsulfat als N-Quelle mit einem Weinsäure-Natriumtartrat-Puffer gepuffert, so ist die pH-Schwankung klein und ein gutes Wachstum beider Partner festzustellen (Seite 571).

Es könnte aber auch sein, dass das positive Ergebnis nicht nur durch die Pufferung zustande kommt, sondern Metalle, die in diesem Puffergemisch sich vorfinden und vorhanden sein werden, könnten eben die Hauptrolle spielen, wie im Versuch mit Aschen von C-N-Quellen gezeigt worden war.

Die Weinsäure wird nun verascht und dem nichtgepufferten Milieu zugegeben. Die Symbiose wächst nicht. Das Natriumtartrat wird ebenfalls verascht und beigegeben. Die Symbiose wächst gut. Fügen wir nun Weinsäureasche und Natriumtartratasche dem ungepufferten Milieu zu, so ist das Wachstum der Symbiose noch viel grösser (Seite 573). *Diese Tatsachen zeigen, dass mit Ammoniumsulfat als N-Quelle die Pufferung nicht die Hauptsache ist, sondern dass die im Puffer vorhandenen Spurenelemente von noch grösserer Bedeutung sind.*

Sakamura [1/2/3] hat wie wir ähnliche Resultate erhalten, aber mit einem andern Pilz. Er stellt fest, dass die Aufnahme von NO_3- oder NH_4-Stickstoff von Metallen abhange.

In unserem Falle wurde gezeigt, dass mit Ammoniumsulfat als N-Quelle das Milieu angesäuert wird. Sind Spurenelemente vorhanden, in Form von Aschenlösungen einiger C-N-Verbindungen, so wird der pH auch angesäuert, aber der Ammonstickstoff kann assimiliert werden.

Dies zeigt, dass Metalle imstande sind, die NH_4-Stickstoffaufnahme bei einem pH zu ermöglichen, ohne welche Metalle dies nicht möglich ist. Es ist nicht gesagt, dass es ein exogener Effekt sei, es kann ebensogut endogen bedingt sein, oder aber beides zusammen.

Mit Ammoniumsulfat als N-Quelle mit den notwendigen Aneurinkomponenten kommen beide Pilze zur Entwicklung. In Symbiose dagegen ist dies nicht der Fall. *Es muss festgehalten werden, dass in Symbiose eine Totalsynthese von Pyrimidin und Thiazol erfolgt, was nicht der Fall ist, wenn wir dem* **Mucor Ramannianus** *Thiazol und der* **Rhodotorula rubra** *Pyrimidin geben.*

Diese Totalsynthese in Symbiose verlangt gegenüber der Teilsynthese (entweder nur P oder nur T) sehr wahrscheinlich ein ganz anderes fermentatives Wirken. Man kann sagen, dass in Symbiose mit Ammoniumsulfat den beiden Partnern irgendein Syntheseverlust zugestossen sein muss, der in den Einzelkulturen gar nicht bemerkt werden konnte. In Symbiose bekommen die beiden Partner weder P noch T von aussen, sie müssen diese Substanzen aus den vorhandenen anorganischen und organischen Verbindungen total synthetisieren. Dieser Syntheseverlust kann, wie gezeigt worden war, in Ammoniumsulfat durch Metalle, die unter anderem in Aschen von Asparagin sich vorfinden, wettgemacht werden. Es kann aber nicht gesagt werden, um was für Metalle es sich hier handelt.

Nitratstickstoff verhält sich ähnlich wie der des Ammoniums. *Mucor Ramannianus mit Thiazol kann Nitratstickstoff assimilieren.*

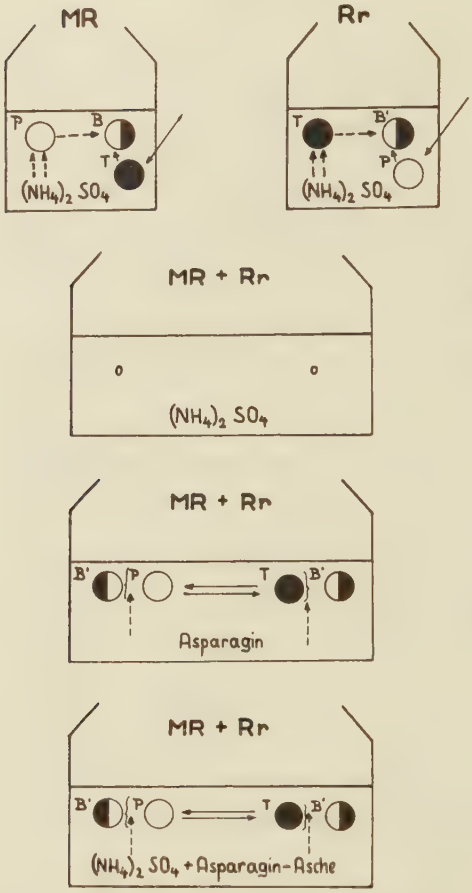


Abbildung 9.

Die beiden Partner, einzeln und in Symbiose in den verschiedenen Milieus gezüchtet.

Erklärung:

MR = *Mucor Ramannianus*
Rr = *Rhodotorula rubra*
P = Pyrimidin, T = Thiazol
gestrichelte Pfeile = Substanz, die synthetisiert wird
ausgezogener Pfeil = nicht synthetisierte Substanz, die als Wachstumsfaktor zuzufügen ist.
Schwarz = T
Weiss = P

Rhodotorula rubra *mit Pyrimidin vermag keinen Nitratstickstoff zu assimilieren. In Symbiose ist das Wachstum wiederum total negativ.*

Die Untersuchungen mit den verschiedensten Metallen haben hier zu positiven Resultaten geführt.

Hg, Al und As ermöglichen es der Hefe bei Anwesenheit von Pyrimidin, Nitrate zu assimilieren, ohne diese gibt es keine Entwicklung. Werden diese Elemente einzeln zugesetzt, so gelangt die Symbiose, ausser mit Al und Hg, nur zu sehr niedrigem Myzelgewichte, was wiederum zeigt, dass wir hier ein Analogon haben zur Ammoniumstickstoffassimilation.

Wir können die Metalle in 3 Gruppen einteilen :

1. *Metalle, die nur das Wachstum der Symbiose fördern und die für die beiden Partner allein unwirksam sind (U, Mo, Sn, Be, Cs)* (Seite 558).
2. *Metalle, die für die Symbiose als auch für den einen oder andern Partner einen Wachstumseffekt hervorrufen (Hg, As, Li, Al).*
3. *Metalle, die auf den einen oder den andern Partner wirken, wenn diesen die notwendige Aneurinkomponente zugegeben wird (Au, Ag, Ra, Ca, Fe, Ti).*

Eine künstliche Metallmischung (Seite 561) mit den *Elementen U, Sn, Li, Cs, Mo, Hg, Al ergab eine additive Wirkung, und die Symbiose erreichte Höchstmyzelgewichte.*

Es wurden keine Metalle gefunden und auch keine Metallmischungen, die bei den einzelnen Partnern das Pyrimidin oder das Thiazol ersetzt hätten.

Diese für die NO_3-Assimilation günstigen Metalle und Metallmischung war für die NH_4-Assimilation ganz negativ. Ebenso waren die für die NH_4-Assimilation günstigen Aschen für die NO_3-Assimilation negativ.

Hier haben wir eine Demonstration, wo gezeigt wird, dass für die NH_4- wie auch für die NO_3-Assimilation nicht dieselben Metalle in Frage kommen.

Allerdings mussten einige Metalle in hoher Konzentration angewandt werden (Al, As), und es wird hier so sein, dass wiederum Verunreinigungen von Metallen das günstige Resultat ergeben, so dass es nicht allein Al oder As war.

Auch bei der Nitratassimilation dürften die Metalle die Rolle als Katalysatoren spielen, sehr wahrscheinlich sogar, und der ganze Ablaufmechanismus wird komplexer Natur sein.

Es wurde noch ein Tastversuch mit den verschiedensten Wuchsstoffen in den verschiedensten Kombinationen gemacht, jedoch war das vorläufige Resultat für NH_4, wie auch für NO_3 im Nährmilieu, negativ ausgefallen. Es wäre nicht ausgeschlossen, dass gewisse Wuchsstoffe durch Metallkomplexe ersetzt werden könnten und umgekehrt. Es handelte sich um folgende Substanzen, die angewendet worden waren : Pantothensäure, Lactoflavin, β-Alanin, Inositol, Adermin, Pimelinsäure und Nikotinsäureamid. Es dürften allerdings noch weitere Untersuchungen gemacht werden, und die angetönte Frage des Ersatzes von Metallen und Wuchsstoffen bleibt noch offen.

Abschliessend möchte ich sagen, *dass die Metalle, insbesondere die Spurenelemente, in der Wuchsstoffsynthese eine massgebende Rolle spielen. Wir haben gesehen, dass anorganisch gebundener Stickstoff nur dann assimiliert werden kann, wenn gewisse Metalle vorhanden*

sind. Ohne solche kam kein Symbiosewachstum zustande. Metalle oder Metallkomplexe ermöglichen der Symbiose, anorganisch gebundenen Stickstoff aufzunehmen, und sehr wahrscheinlich katalysieren sie dabei die Wuchsstoffsynthese.

B. Zusammenfassung.

Es wird bestätigt, dass *Rhodotorula rubra,* ein Pyrimidinpilz, und dass *Mucor Ramannianus,* ein Thiazolpilz, zusammen in Symbiose kultiviert werden können, ohne Wuchsstoffzugabe.

Ferner konnte kein Milieu gefunden werden, wo die beiden auxoheterotrophen Organismen auxo-autotroph werden.

Die Auxo-Heterotrophie bleibt auch in Symbiose bestehen, indem jeder Pilz eine Aneurinhälfte synthetisiert, und die andere bekommt er von seinem Partner.

Damit das Wachstum dieser künstlichen Symbiose zustande kommen kann, braucht es eine organische C-N-Verbindung.

Werden Stickstoffverbindungen anorganischer Herkunft verwendet, so gelingt die Symbiose nicht mehr, es sei denn, es werden Metalle oder Metallmischungen angewendet, die, als Katalysatoren funktionierend, die Assimilation von anorganischem Stickstoff ermöglichen.

NH_4-Stickstoff braucht andere Metalle als NO_3-Stickstoff, um von der Symbiose aufgenommen werden zu können. Dabei sind die Metalle in Form von Spurenelementen vorhanden.

Wird ein Nährmilieu mit NH_4 als Stickstoffquelle gepuffert, so erfolgt ein Wachstum der Symbiose. Dieses Zustandekommen des Symbiosewachstums in gepuffertem Milieu ist nicht durch die Pufferung selbst, sondern durch Verunreinigung des Puffers an Spurenelementen bedingt. Wird der Puffer verascht und die Asche dem ungünstigen Milieu zugegeben, so erfolgt ein Wachstum der Symbiose.

Organische C-N-Verbindungen wirken nicht nur dadurch für die Symbiose günstig, dass sie Kohlenstoff und Stickstoff in derselben Verbindung enthalten, sondern dieselben sind ebenfalls mit Spurenelementen verunreinigt, welche nun die Symbiose fördern. Werden nämlich solche C-N-Verbindungen (Asparagin, Harnstoff, Glutaminsäure) verascht und die Asche einem ungünstigen Milieu zugefügt, so gelingt das Symbiosewachstum ebenfalls. Diese Aschenlösungen wirken nur im NH_4-Milieu positiv, während sie für NO_3 negativ sind.

In Symbiose erfolgt das Wachstum der beiden Pilze in langsamem Rhythmus, gegenüber ihrer getrennten Kultur in Anwesenheit eines Wachstumsfaktors. Dies zeigt, dass in Symbiose unter diesen Bedingungen Stoffwechsel und Biosynthese anders verlaufen gegenüber den getrennten Einzelkulturen.

Somit wird gezeigt, dass die Züchtung und die Entwicklung der künstlichen Symbiose *Mucor Ramannianus-Rhodotorula rubra* andere Bedingungen verlangt, als diejenigen der Einzelpartner, und die am Anfang der Arbeit gestellte Frage kann somit bejahend beantwortet werden und wird Anlass geben zu weiteren Untersuchungen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Bern, in der Zeit vom Oktober 1938 bis zum September 1941 ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. W. H. Schopfer, unter dessen Anregung und Leitung die vorliegende Arbeit ausgeführt wurde, möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen für seine wertvolle Unterstützung und das grosse Interesse, das er meiner Arbeit stets entgegengebracht hatte.

C. Literatur.

Andersag, H. und Westphal, K.: Ueber die Synthese des antineuritischen Vitamins. Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 2035 (1937).

Bary, de: Die Erscheinung der Symbiose. Tagebl. d. 51. Vers. Deutsch. Naturf. u. Aerzte zu Cassel, 1878.

Bertrand, G.: Sur l'importance physiologique du manganèse et d'autres éléments contenus dans les organismes à l'état de traces. Erg. Vitamin- und Hormonforschung 2, 191 (1939).

Bonner, J. and Greene, J.: Vitamin B_1 and the growth of green plants. Bot. Gaz. 100, 226 (1938).

Boresch, K.: Gesamtumsätze bei Pflanzen, insbesonders bei den autotrophen. Handb. d. norm. pathol. Physiol. 5, Berlin (Springer).

Freundler, P.: Introduction à l'étude des complexes biologiques. Edit.: E. Belin, Paris, 1928, p. 150.

Fromageot, Cl. et J.-L. Tchang: Sur la synthèse des Pigments caroténoïdes par Rhodotorula Sanniei. Arch. Mikrobiol. 9, 434 (1938).

Gause, G. F.: Die Raumstruktur des Protoplasmas. Erg. Biol. 13, 54 (1936).

Knigth, B. C. J. G.: The nutrition of Staphylococcus aureus: Nicotinic acid and vitamin B_1. Biochem. J. 31, 731 (1937).

Kögl, F. und Fries, N.: Ueber den Einfluss von Biotin, Aneurin und Mesoinosit auf das Wachstum verschiedener Pilzarten. Hoppe-Seylers Z. 249, 93 (1937).

Lohmann, G.: Nährstoffwirkung und Giftwirkung bei Aspergillus niger. Arch. Mikrobiol. 5, 35 (1934).

Müller, W. F.: (1) Zur Physiologie von Mucor Ramannianus. Ber. schweiz. bot. Ges. 47, 277 (1937).

— (2) Zur Wirkstoffphysiologie von Mucor Ramannianus. Diss. Bern. Ber. schweiz. Bot. Ges. 51, 165 (1941).

— et W.-H. Schopfer: L'action de l'aneurine et de ses constituants sur Mucor Ramannianus Möll. C. r. Acad. Sci. Paris 205, 687 (1937).

Ondratschek, K.: Ueber die Brauchbarkeit einiger Glassorten für Algenreinkulturen. Arch. Mikrobiol. 6, 532 (1935).

Osterhout, W. J. V.: (1) On the Importance of Physiologically Balanced Solution for Plants. I. Marine Plants. Bot. Gaz. 42, 1927 (1906).

Rivers, T. M.: Bacillus haemoglobinophilus canis. J. Bact. 7, 579 (1922).

Sakamura, T.: (1) Die Resorption des NH_4- und NO_3-Stickstoffs durch Aspergillus niger. Planta 11, 765 (1930).

Sakamura, T.: (2) Ammonio-Nitratophilie bei Aspergillus oryzae im besonderen Zusammenhang mit Schwermetallen. J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. 4, Serie V, 2 (1935).
— (3) Ueber die Ammoniak- und Nitrataufnahme bei Aspergillus oryzae, mit besonderer Rücksicht auf die Wirkung einiger Schwermetalle und Zuckerarten. Fac. of Sci. Hokkaido Imp. Univ., Serie V, Vol. IV, Nr. 5, 177—239 (1941).
Schopfer, W.-H.: (1) Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez Phycomyces blakesleeanus. Bull. Soc. bot. suisse 40, 87 (1931).
— (2) Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez Phycomyces bl. Influence des substances vitaminiques. Bull. Soc. suisse bot. 41, 73 (1932).
— (3) L'action des constituants de l'aneurine sur des levures. C. r. Acad. Sci. Paris, 205, 445 (1937).
— (4) Recherches sur le métabolisme de l'azote d'un microorganisme acellulaire (Phycomyces blakesleeanus). Le rôle des facteurs de croissance. Protoplasma (Berl.) 28, 381 (1937).
— (5) Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen mit besonderer Berücksichtigung des Vitamins B_1. Erg. Biol. 16, 1 (1939).
— (6) La pyrimidine (2-méthyl-4-amino-5-aminométhyl-pyrimidine) facteur de croissance de microorganismes (Rhodotorula rubra, Mucorinées, Dematium). Protoplasma (Berl.) 31, 105 (1938).
— und S. Blumer unter Mitwirkung von V. Kocher: Untersuchungen über die Biologie von Ustilago violacea. II. Wirkung des Aneurins und anderer Wuchsstoffe vitaminischer Natur. Arch. f. Mikrobiol. 9, 305 (1938).
— et A. Jung: L'action des produits de désintégration de l'aneurine sur Phycomyces blakesleeanus. Le second facteur de croissance de Mucorinées. C. r. Acad. Sci. Paris 204, 155 (1937).
— et Rytz, W. jr.: La ouate comme source de facteur de croissance de microorganisme. Arch. Mikrobiol. 8, 244 (1937).
— et H. Utiger: L'eau de mer, source de catalyseurs minéraux pour la culture d'un microorganisme. C. r. Soc. de Physique et d'Histoire nat. Genève 58, 135 (1941).
Steinberg, R. A.: (1) A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of Aspergillus niger. Am. Journ. Bot. 6, 330 (1919).
— (2) The nutritional requirements of the fungus, Aspergillus niger. Bull. Torrey Club Bot. 62, 81 (1935).
— (3) Applicability of nutrient solution purification to the study of trace element requirements of Rhizobium and Azotobacter. Journ. Agr. Res. 57, 461 (1938).
— (4) The nutritional requirements of the fungus Aspergillus niger. Bull. Torrey bot. Club 62, 81 (1935).
Todd, A. R. and Bergel, F: Aneurin. Part. VII. A synthesis of aneurin. J. amer. Soc. Lond. 1937, 364.
Wattenberg, H.: Ergebnisse der dtsch. Meteor-Expedition 1925—1927. Bd. 8 (Berlin: de Gruyter, 1933).
Williams, R. R.: Structure of vitamin B_1. Amer. J. chem. Soc. 57, 229 (1935).
— R. E. Waterman, J. C. Keresztesy and E. R. Buchman: Studies of crystalline vitamin B_1. III. Cleavage of vitamin with sulfite. J. Amer. chem. Soc. 57, 536 (1935).
Windaus, A. R., Tschesche, H., H. Ruhkopf, F. Laquer und F. Schultz: Die Darstellung von kristallisiertem antineuritischem Vitamin aus Hefe. Hoppe-Seylers Z. 204, 123 (1933).

Curriculum vitae.

Ich wurde am 24. Juli 1913 in Zürich-Oerlikon geboren und bin Bürger von Baar, Kt. Zug. In Zürich besuchte ich die Primar- und anschliessend 3 Jahre die Sekundarschule. Im Frühjahr 1929 trat ich eine Lehre an, um den Beruf eines Drogisten zu erlernen. Nach 3 Jahren schloss ich meine Lehre mit der Fachprüfung ab. Hierauf bereitete ich mich an einem Privatinstitute auf die Maturitätsprüfung vor, was 3 ½ Jahre in Anspruch nahm. Im Frühjahr 1936 immatrikulierte ich mich an der Universität Bern, wo ich bis zum Herbst 1937 blieb und das Wintersemester 1937/1938 an der Sorbonne (Paris) belegte. Vom Sommersemester 1938 bis Winter 1941 studierte ich in der Folge immer an der Universität Bern. Vom Herbst 1938 bis Winter 1941 war ich zudem noch Assistent am Botanischen Institut der Universität Bern (Prof. Schopfer).